



**INSTITUTO POLITÉCNICO  
DE BRAGANÇA** Escola Superior Agrária

## **Caracterização de Mel com vista à Produção de Hidromel**

**Ana Paula Rodrigues Pereira**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança  
Alimentar*

Orientado por

**Prof<sup>a</sup> Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho**  
**Doutora Joaquina Teresa Gaudêncio Dias**

Esta dissertação inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri

**Bragança**  
**2008**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia e Biotecnologia da Escola Superior Agrária de Bragança e contou com o apoio financeiro de uma bolsa de investigação concedida no âmbito do **Projecto PTDC/AGR-ALI/68284/2006** “Optimização das Condições de Produção de Hidromel”, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

## **Agradecimentos**

Embora este trabalho seja pessoal, não é o fruto do esforço de uma só pessoa. De maneira humilde e com o maior prazer, gostaria de agradecer a várias pessoas, que deram o seu valioso contributo para que esta tese se concretizasse.

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Letícia Estevinho, pelo acompanhamento e orientação deste trabalho e pelos conhecimentos transmitidos. Agradecer a dedicação, o incentivo, a disponibilidade e a ajuda que levaram este trabalho a "bom porto".

À Doutora Teresa Dias, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu, pela ajuda ao longo do trabalho, pela compreensão e disponibilidade. Também pelo apoio e incentivo.

Ao Doutor João Verdial Andrade e ao Engº Jorge Sá Morais, pela disponibilidade, pela ajuda e incentivo, pelos conhecimentos enriquecedores e pela experiência partilhada.

À Doutora Elsa Ramalhosa, pela simpatia, pela disponibilidade e ajuda no trabalho escrito.

A todos os professores do Mestrado, na pessoa do Doutor José Alberto Pereira, pelo incentivo e insistência na frequência deste Curso.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia, Dª Arminda, Dª Fátima, Leandro, e aos que vão passando, pela boa disposição e pelo bom ambiente de trabalho proporcionado.

Aos amigos, Anabela, Sofia, Ivo, Soraia e, especialmente, Daniela, a quem devo esta tese, agradeço o estarem presentes nos bons e nos maus momentos, os conselhos, o incentivo e apoio. Obrigado pelos bons momentos passados, que ajudavam a superar o trabalho e ficarão guardados na memória.

À minha família, ao Hugo e à família dele, pelo apoio incondicional e incentivo. Agradeço a ajuda nas horas mais difíceis.

# ÍNDICE

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE TABELAS .....	vii

## CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO ..... 1

1.1. INTRODUÇÃO GERAL AO TEMA.....	2
1.2. CARACTERIZAÇÃO DO MEL.....	4
1.2.1. Definição.....	4
1.2.2. Composição e propriedades físico-químicas .....	4
1.2.2.1. Hidratos de carbono.....	5
1.2.2.2. Água .....	5
1.2.2.3. Ácidos orgânicos .....	6
1.2.2.4. Minerais.....	7
1.2.2.5. Cinzas.....	7
1.2.2.6. Compostos azotados .....	7
1.2.2.7. Compostos voláteis.....	8
1.2.2.8. Compostos fenólicos .....	8
1.2.2.9. Outros compostos .....	9
1.2.2.10. Cor.....	9
1.2.2.11. Espectro polínico.....	10
1.3. MICROBIOTA DO MEL.....	10
1.4. PROPRIEDADES BIOACTIVAS DO MEL .....	13
1.4.1. Actividade antioxidante.....	13
1.4.2. Actividade antimicrobiana.....	14
1.5. HIDROMEL .....	16

## CAPÍTULO II: MATERIAL E MÉTODOS..... 21

2.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E POLÍNICA DO MEL.....	22
2.1.1. Humidade.....	22
2.1.2. Condutividade Eléctrica .....	22
2.1.3. Cinzas Totais.....	22
2.1.4. pH .....	22
2.1.5. Acidez.....	23
2.1.6. Hidroximetilfurfural (HMF) .....	23
2.1.7. Índice Diastásico .....	23
2.1.8. Açúcares Redutores .....	24

2.1.9. <i>Análise polínica</i> .....	25
2.2. SELECÇÃO DE ESTIRPES DE LEVEDURAS E PRODUÇÃO DE HIDROMEL .....	25
2.2.1. <i>Caracterização de estirpes de leveduras para a produção de hidromel</i> .....	25
2.2.1.1. Efeito do sulfuroso na cinética de crescimento de estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
2.2.1.2. Efeito do etanol na cinética de crescimento de estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
2.2.1.3. Efeito dos açúcares na cinética de crescimento de estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	26
2.2.2. <i>Produção de hidromel</i> .....	27
2.2.2.1. Suplemento 1.....	27
2.2.2.2. Suplemento 2.....	28
2.2.3. <i>Quantificação de glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético por HPLC</i> .....	29
2.2.4. <i>Tratamento dos resultados</i> .....	29
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E POLÍNICA DO MEL.....	32
3.2. SELECÇÃO DE ESTIRPES DE LEVEDURAS E PRODUÇÃO DE HIDROMEL .....	35
3.2.1. <i>Caracterização de estirpes de leveduras para a produção de hidromel</i> .....	35
3.2.1.1. Efeito do sulfuroso na cinética de crescimento de estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	36
3.2.1.2. Efeito do etanol na cinética de crescimento de estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	37
3.2.1.3. Efeito dos açúcares na cinética de crescimento de estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	40
3.2.2. <i>Comportamento fermentativo das estirpes seleccionadas</i> .....	41
3.2.3. <i>Produção de hidromel</i> .....	44
<b>CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO V: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO VI: ANEXOS</b> .....	<b>62</b>
ANEXO I.....	63
ANEXO II .....	66

## RESUMO

O mel é um produto natural, ao qual são reconhecidas propriedades físicas e químicas que contribuem para a sua actividade biológica. No entanto, o mel actualmente, é comercializado a preços reduzidos, tornando-se imperioso encontrar alternativas que viabilizem as explorações apícolas nacionais. Uma destas alternativas passa pela produção de hidromel.

Apesar das excelentes propriedades do mel, a produção de hidromel enfrenta alguns problemas, nomeadamente, atrasos e amuos da fermentação, falta de uniformidade do produto e produção de compostos, pelas leveduras, com aroma desagradável. Estes problemas podem estar associados ao facto das leveduras utilizadas na fermentação serem leveduras enológicas que, provavelmente, não estão adaptadas às condições de *stress* do mel.

Este trabalho teve como objectivos a caracterização do mel da região de Trás-os-Montes (Nordeste de Portugal), a selecção de leveduras isoladas de mel para a produção de hidromel e a optimização das condições de produção de hidromel.

A primeira parte do trabalho consistiu na caracterização do mel utilizado na produção de hidromel. O mel analisado mostrou ser um produto de qualidade, que cumpria os parâmetros estabelecidos na legislação portuguesa.

Na segunda parte avaliou-se a capacidade de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de mel português para produzir hidromel. Para tal, cinco estirpes isoladas de mel, uma estirpe de referência e uma estirpe comercial, utilizada em enologia, foram avaliadas e comparadas em termos da sua resistência ao sulfuroso, ao etanol, e *stress* osmótico. Todas as estirpes exibiram um comportamento semelhante às condições de *stress* estudadas.

Destas estirpes foram seleccionadas a comercial e, aleatoriamente, duas estirpes isoladas de mel para a produção de hidromel. As três estirpes foram submetidas a fermentações com dois méis diferentes (um claro e um escuro) enriquecidos com dois suplementos (1: comercial; 2: desenvolvido pela equipa de investigação). Para avaliar o desempenho das fermentações determinou-se o crescimento da levedura e a produção de etanol, glicerol e ácido acético. As estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de mel mostraram ser apropriadas para a produção de hidromel. No entanto, é necessário ter em consideração as características do mel e dos suplementos utilizados na formulação do meio de fermentação.

**Palavras-chave:** Caracterização do mel, hidromel, *Saccharomyces cerevisiae*, selecção de estirpes, fermentação, condições de *stress*.

## ABSTRACT

Honey is a natural product with recognized physical and chemical properties, which contribute to its biological activity. However, honey is currently being sold at low prices, making it imperative to find alternatives to make apiculture a viable national enterprise. One of these alternatives could be mead production.

Despite the excellent properties of honey, mead production faces several problems, namely, delays and “pouts” fermentations, lack of uniformity of the product and production of off-*flavours* by the yeasts. These problems can be usually associated with the fact, the yeast used in fermentation are yeast wine, which probably will not be adapted to the *stress* of honey.

The main objectives of this work were the characterization of Trás-os-Montes (Northeast Portugal) honey, the selection of yeasts isolated from honey for mead production and the optimization of conditions for mead production.

The first part of the work consisted in the characterization of honey used in the mead production. The analysed honey has shown to be a quality product that met the parameters established in Portuguese legislation.

In the second part, the ability of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Portuguese honey to produce mead was evaluated. So, five strains isolated from honey, a reference strain and a commercial strain used in oenology, were evaluated and compared in terms of their resistance to ethanol, sulphur dioxide and osmotic *stress*. All strains exhibited similar behaviour to the conditions of *stress* studied.

Of these strains, for mead production it were selected two strains isolated from honey (randomly) and the commercial one. The three strains were subjected to fermentations with two different honeys (a light and a dark honeys) enriched with two supplements (1: commercial; 2: developed by research the team). To evaluate the fermentation performance it was determined the yeast growth and the production of ethanol, glycerol and acetic acid. The *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from honey had shown to be appropriate for mead production. However, it is necessary to have into account the characteristics of the honey and supplements used in the fermentation medium formulation.



**Keywords:** Honey characterization, mead, *Saccharomyces cerevisiae*, strain selection, fermentation, *stress* factors.

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo da estirpe 4 de <i>S. cerevisiae</i> (isolada de mel), crescida na ausência e na presença de diferentes concentrações de SO <sub>2</sub> .	36
<b>Figura 2.</b> Variação do número de células viáveis em função do tempo, para a estirpe 4 de <i>S. cerevisiae</i> (isolada do mel), na ausência e na presença de diferentes concentrações de SO <sub>2</sub> .	37
<b>Figura 3.</b> Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de sete estirpes de <i>S. cerevisiae</i> , crescidas na presença de 10% (v/v) de etanol: estirpes 1, 2, 4, 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 3 – estirpe de referência; estirpe 7 – estirpe comercial.	38
<b>Figura 4.</b> Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de sete estirpes de <i>S. cerevisiae</i> : estirpes 1, 2, 4, 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 3 – estirpe de referência; estirpe 7 – estirpe comercial.	38
<b>Figura 5.</b> Variação do número de células viáveis em função do tempo, para a estirpe 4 de <i>S. cerevisiae</i> (isolada do mel), na presença de diferentes concentrações de etanol.	39
<b>Figura 6.</b> Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de sete estirpes de <i>S. cerevisiae</i> , submetidas a <i>stress</i> osmótico (20% (p/v) glucose + 20% (p/v) frutose): estirpes 1, 2, 4, 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 3 – estirpe de referência; estirpe 7 – estirpe comercial.	40
<b>Figura 7.</b> Comportamento das estirpes 5 (A), 6 (B) e 7 (C) em meio de cultura YPD suplementado com 20% (p/v) de glucose e 20% (p/v) de frutose.	43

**Figura 8.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de três estirpes de *S. cerevisiae*, utilizadas na produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 1: estirpes 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 7 – estirpe comercial. **44**

**Figura 9.** Comportamento da estirpe 6 de *S. cerevisiae* durante a produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 1. **45**

**Figura 10.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de três estirpes de *S. cerevisiae*, utilizadas na produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 1: estirpes 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 7 – estirpe comercial. **46**

**Figura 11.** Comportamento da estirpe 6 de *S. cerevisiae* durante a produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 1. **46**

**Figura 12.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de três estirpes de *S. cerevisiae*, utilizadas na produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 2: estirpes 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 7 – estirpe comercial. **48**

**Figura 13.** Comportamento da estirpe 6 de *S. cerevisiae* durante a produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 2. **48**

**Figura 14.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de três estirpes de *S. cerevisiae*, utilizadas na produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 2: estirpes 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 7 – estirpe comercial. **50**

**Figura 15.** Comportamento da estirpe 6 de *S. cerevisiae* durante a produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 2. **50**

## ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela 1.</b> Caracterização polínica das amostras de mel utilizadas na produção de hidromel.	32
<b>Tabela 2.</b> Caracterização físico-química das amostras de mel utilizado na produção de hidromel.	33
<b>Tabela 3.</b> Taxas específicas de crescimento de sete estirpes de <i>S. cerevisiae</i> na ausência e na presença de concentrações de SO <sub>2</sub> de 100 e 250 mg/L.	36
<b>Tabela 4.</b> Taxas específicas de crescimento de sete estirpes de <i>S. cerevisiae</i> na ausência e na presença de 10% (v/v) de etanol.	39
<b>Tabela 5.</b> Taxas específicas de crescimento de sete estirpes de <i>S. cerevisiae</i> na ausência e na presença de concentrações de açúcar de 40% (20% (p/v) glucose + 20% (p/v)).	41
<b>Tabela 6.</b> Quantificação dos produtos da fermentação (etanol, glicerol e ácido acético (g/L)) e dos açúcares consumidos (glucose e frutose (g/L)) durante fermentações conduzidas por três estirpes de <i>S. cerevisiae</i> , em meio YPD contendo 20% (p/v) de glucose e 20% (p/v) de frutose.	42
<b>Tabela 7.</b> Quantificação dos produtos de fermentação (etanol, glicerol e ácido acético (g/L)) durante a produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 1.	45
<b>Tabela 8.</b> Quantificação dos produtos de fermentação (etanol, glicerol e ácido acético (g/L)) durante a produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 1.	47

**Tabela 9.** Quantificação dos produtos de fermentação (etanol, glicerol e ácido acético (g/L)) durante a produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 2. **49**

**Tabela 10.** Quantificação dos produtos de fermentação (etanol, glicerol e ácido acético (g/L)) durante a produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 2. **51**

# CAPÍTULO I

## *Introdução*

## 1.1. INTRODUÇÃO GERAL AO TEMA

O mel é um produto natural utilizado desde os primórdios da humanidade na medicina tradicional, tendo adquirido popularidade entre os Egípcios, Árabes, Gregos e outras civilizações.

Este produto é consumido em larga escala no mundo inteiro e desempenha um papel importante na dieta humana, sendo também utilizado nas indústrias alimentar, farmacêutica, e de cosméticos.

Ao nível da agricultura Portuguesa, o mel é um produto alimentar de grande relevância, envolvendo mais de 26000 apicultores, com um valor de produção na ordem das 11000 toneladas por ano.

A apicultura apresenta-se, nesta região, como uma actividade que é necessário incentivar quer pela produção de mel de qualidade, constituindo uma fonte de rendimento da população de Trás-os-Montes, quer pela produção de outros produtos da colmeia e de derivados do mel.

Na região de Trás-os-Montes, associada à constante formação dos apicultores e à grande qualidade do mel atingida ao nível da produção, extracção e comercialização já existem quatro Associações com Denominação de Origem (DOP) para o seu mel:

- Associação dos Apicultores do Parque Natural de Montesinho;
- Cooperativa de Produtores de Mel da Terra Quente;
- CAPOLIB – Agrupamento de Apicultores de “Mel do Barroso”;
- MONTIMEL – Cooperativa dos Apicultores do Alto Tâmega.

Outras associações e cooperativas efectuem francos melhoramentos de forma a obter a mesma designação.

A actividade apícola nesta região é dinâmica e encontra-se em franca expansão, porém o mel nacional de qualidade sofre uma forte concorrência de países Asiáticos e da América do Sul, onde os custos de produção são negligenciáveis e é comercializado abaixo destes custos. Assim, torna-se urgente valorizar o mel nacional e, simultaneamente, encontrar alternativas para o escoamento deste produto. Estas alternativas podem passar pela produção de hidromel, de forma a que os apicultores consigam superar as dificuldades financeiras que atravessam na actualidade. No entanto, este produto apesar de ser uma das bebidas alcoólicas mais antigas, continua a ser produzido de uma forma empírica e artesanal, deparando-se o apicultor com inúmeros

problemas durante a fermentação. Para obviar esta situação, torna-se imperioso otimizar as condições de produção desta bebida.

O presente trabalho teve como objectivos:

- Caracterização físico-química e polínica do mel da região de Trás-os-Montes;
- Caracterização de leveduras utilizadas na produção de hidromel;
- Contribuição para a optimização das condições de produção de hidromel em cultura descontínua.



## **1.2. CARACTERIZAÇÃO DO MEL**

### **1.2.1. Definição**

De acordo com o Decreto-Lei 214/2003 de 18 de Setembro, entende-se por mel a “substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insectos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia”.

Segundo o mesmo diploma, os principais tipos de mel podem ser divididos consoante a origem e consoante o modo de produção e ou de apresentação. Consoante a origem existe mel de néctar ou mel de flores, “mel obtido a partir do néctar das plantas”, e mel de melada, “mel obtido principalmente a partir de excreções de insectos sugadores de plantas (*hemiptera*) que ficam sobre as partes vivas das plantas ou de secreções provenientes de partes vivas das plantas”. De acordo com o modo de produção ou de apresentação o mel pode ser classificado em mel em favos, mel com pedaços de favos, mel escorrido, mel centrifugado, mel prensado ou mel filtrado.

### **1.2.2. Composição e propriedades físico-químicas**

A composição do mel é variável e depende da fonte floral usada na recolha do néctar, do clima, das condições ambientais e sazonais, bem como do manuseamento e do processamento (Anklam, 1998; Al-Mamary *et al.*, 2002; Azeredo *et al.*, 2003; Arráez-Román *et al.*, 2006; Baltrušaitytė *et al.*, 2007; Küçük *et al.*, 2007).

O mel contém cerca de 200 substâncias (Al-Mamary *et al.*, 2002; Arráez-Román *et al.*, 2006; Küçük *et al.*, 2007), sendo as principais, os hidratos de carbono, e as secundárias, os minerais, proteínas, vitaminas, lípidos, ácidos orgânicos, aminoácidos (Finola *et al.*, 2007), compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), enzimas e outros fitoquímicos (Bertoncelj *et al.*, 2007).

A qualidade do mel é determinada pelas suas propriedades sensoriais, físicas e químicas. As suas propriedades físicas e químicas dependem do néctar e pólen da fonte

floral, da cor, do aroma, da humidade e do conteúdo em proteínas e açúcares (Azeredo *et al.*, 2003).

Estas propriedades são avaliadas através de parâmetros estabelecidos na Norma do Codex Alimentarius (Anónimo, 2001) e no Decreto-Lei 214/2003 de 18 de Setembro, e incluem pH, teor de água, teor de açúcares redutores, teor de sacarose, teor de matérias insolúveis na água, teor de minerais, condutividade eléctrica, teor de cinzas, acidez, teor de hidroximetilfurfural (HMF) e índice diastásico.

#### **1.2.2.1. Hidratos de carbono**

Os hidratos de carbono são os constituintes maioritários do mel. Correspondem a cerca de 95 a 99% da matéria seca (Olaitan *et al.*, 2007), e são essencialmente a frutose (38,4%), a glucose (30,3%) e a sacarose (1,3%) (Iurlina e Fritz, 2005). Os outros hidratos de carbono constituem cerca de 12% (Iurlina e Fritz, 2005), e incluem dissacarídeos, como maltose e isomaltose, trissacarídeos e tetrassacarídeos (Anklam, 1998).

Os açúcares redutores, glucose e frutose, são os constituintes maioritários do mel (Küçük *et al.*, 2007), sendo o teor mínimo permitido na legislação portuguesa 60g/100g de mel. A proporção de frutose em relação à glucose depende bastante da fonte de néctar (Anklam, 1998), sendo, geralmente, 1,2/1, a proporção de frutose/glucose (de Rodríguez *et al.*, 2004). Esta proporção pode influenciar tanto o *flavour* do mel, pois a frutose é mais doce que a glucose, como a sua granulação, uma vez que a glucose é menos solúvel em água que a frutose. Assim, os méis com razões frutose/glucose superiores permanecem líquidos durante períodos maiores (de Rodríguez *et al.*, 2004; Finola *et al.*, 2007).

Um conteúdo elevado de sacarose aparente no mel pode significar uma recolha prematura, já que a sacarose ainda não foi totalmente dissociada em glucose e frutose, pela acção da enzima invertase, secretada pelas abelhas (Küçük *et al.*, 2007). Pode indicar, ainda, uma adulteração do mel (Sodré *et al.*, 2007). Para este parâmetro, o valor máximo permitido no mel é 5%, podendo existir excepções para alguns tipos de mel.

#### **1.2.2.2. Água**

A água é o segundo componente mais importante do mel. A actividade da água do mel varia entre 0,5 e 0,6 (Iurlina e Fritz, 2005).

O conteúdo de água do mel depende de vários factores, como por exemplo, da época de colheita, do grau de maturação alcançado na colmeia e de factores climáticos (Finola *et al.*, 2007). Este parâmetro vai influenciar uma das propriedades físicas do mel, a viscosidade (Olaitan *et al.*, 2007).

De acordo com a legislação portuguesa (Decreto-Lei 214/2003 de 18 de Setembro) o limite máximo de água no mel é 20%. O mel com um conteúdo de água excessivo pode apresentar dificuldades na preservação e armazenamento (Olaitan *et al.*, 2007). De facto, este factor contribui para a estabilidade do mel prevenindo a sua fermentação e granulação durante o armazenamento (Küçük *et al.*, 2007).

### **1.2.2.3. Ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos constituem cerca de 0,57% do mel, e incluem o ácido glucónico, que é um produto resultante da digestão enzimática da glucose (Olaitan *et al.*, 2007). Foram ainda identificados os ácidos pirúvico, málico, cítrico, succínico e fumárico. Os ácidos orgânicos são os responsáveis pela acidez do mel e contribuem consideravelmente para o seu sabor característico (Anklam, 1998).

Valores de acidez abaixo do limite máximo estabelecido, 50 miliequivalentes de ácidos por 1000 gramas de mel, indicam a ausência de fermentações indesejáveis (Finola *et al.*, 2007), pois a presença de leveduras xerotolerantes pode ser responsável pelo aumento da sua acidez (de Rodríguez *et al.*, 2004).

Os méis multiflorais apresentam valores de acidez inferiores (Küçük *et al.*, 2007). De facto, o tipo floral (Küçük *et al.*, 2007) e a época de colheita (de Rodríguez *et al.*, 2004) do mel, são dois factores que influenciam a acidez do mel. Finola *et al.* (2007) verificaram uma relação inversa entre a acidez livre e o teor de cinzas do mel. Estes autores explicaram esta relação considerando que um teor de minerais mais elevado corresponde a uma maior fracção de ácidos salinizados presentes.

O pH do mel varia entre 3,4 e 6,1 com um valor médio de 3,9 (Iurlina e Fritz, 2005), no entanto, este parâmetro não está directamente relacionado com a acidez livre devido à acção tampão dos ácidos e minerais presentes no mel (de Rodríguez *et al.*, 2004).

#### **1.2.2.4. Minerais**

Os minerais estão presentes em pequenas quantidades no mel, e o seu conteúdo varia entre 0,04% nos méis claros e 0,2% em alguns méis escuros (Anklam, 1998). O potássio é o mais abundante (Anklam, 1998; Olaitan *et al.*, 2007), mas encontram-se outros minerais, como cálcio, cobre, ferro, manganês e fósforo (Olaitan *et al.*, 2007). O conteúdo em minerais do mel pode fornecer indicações acerca da poluição ambiental ou da origem geográfica do mel (Anklam, 1998).

#### **1.2.2.5. Cinzas**

O mel normalmente, apresenta um baixo teor de cinzas, o qual depende do material recolhido pelas abelhas durante a recolha de néctar e melada (de Rodríguez *et al.*, 2004). Os valores obtidos para este parâmetro estão relacionados com o teor em minerais do mel. Uma dispersão elevada do teor de cinzas entre amostras de mel, pode indicar que o processo de recolha e/ou as técnicas utilizadas pelos produtores não são uniformes (Finola *et al.*, 2007). Os méis de cor clara têm, normalmente um teor de cinzas mais baixo que os méis de cor escura (Finola *et al.*, 2007).

#### **1.2.2.6. Compostos azotados**

O conteúdo de proteínas do mel é, aproximadamente 0,2% (Anklam, 1998; Iurlina e Fritz, 2005), provenientes das abelhas e das plantas. Uma pequena fracção das proteínas são enzimas, nas quais se incluem a invertase, diastase, glucose oxidase, catalase (Anklam, 1998),  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase e amilase (Won *et al.*, 2008). Assim, a actividade enzimática pode indicar a exposição do mel ao calor durante o processamento e armazenamento. Esta varia bastante entre amostras de mel porque as abelhas adicionam ao mel diferentes quantidades de saliva, consoante as condições climáticas (Anklam, 1998).

O conteúdo de azoto do mel é reduzido e varia bastante, sendo o valor médio cerca de 0,04% (Anklam, 1998). Os compostos nitrogenados são essencialmente alcalóides, derivados da clorofila, aminoácidos e aminas (Al-Mamary *et al.*, 2002). Relativamente aos aminoácidos, a prolina é dominante mas também já se identificou arginina, triptofano e cisteína, cuja presença é característica em alguns tipos de mel (Anklam, 1998). A análise do perfil de aminoácidos é mais adequada para a detecção da origem botânica e geográfica do mel do que a composição proteica (Anklam, 1998).

O índice diastásico e o teor em HMF são parâmetros indicadores da frescura do mel (de Rodríguez *et al.*, 2004; Küçük *et al.*, 2007). Os limites estabelecidos para estes dois parâmetros são um mínimo de 8, para o índice diastásico e um máximo de 40 mg/kg, para o HMF. O HMF pode ser formado pela desidratação da hexose em meio ácido ou pelas reacções de Maillard. O aquecimento e a temperatura e duração do armazenamento podem aumentar o nível de HMF. Um mel de elevada qualidade deverá ter um índice diastásico elevado e um teor de HMF baixo (Küçük *et al.*, 2007). O índice diastásico está intimamente relacionado com o tratamento térmico do mel, não sendo um parâmetro adequado para detectar a sua origem (Anklam, 1998).

#### **1.2.2.7. Compostos voláteis**

Os compostos voláteis do mel são responsáveis pelo seu *flavour* característico (Finola *et al.*, 2007). Muitos destes compostos provêm do néctar das flores, e já foram identificados mais de 300, incluindo ácidos, álcoois, cetonas, aldeídos, terpenos e ésteres (Castro-Vázquez *et al.*, 2009).

A presença destes compostos pode fornecer informações acerca da origem botânica do mel, e se foi produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores ou de exsudados secretados pelas plantas ou insectos (Escriche *et al.*, 2009).

#### **1.2.2.8. Compostos fenólicos**

O mel contém, ainda, uma enorme variedade de compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), como constituintes secundários.

Os principais flavonóides presentes no mel pertencem aos grupos das flavanonas e flavonas (Anklam, 1998). Os principais flavonóides presentes no mel são miricetina, tricetina, quercetina, hesperatina, luteolina, caempferol, pinocembrina, crisina, pinobanksina, genkvanina e galangina (Anklam, 1998; Yao *et al.*, 2004; Baltrušaitytė *et al.*, 2007; Bertonecelj *et al.*, 2007). Foram ainda detectados os flavonóides caempferide, quercetina 3',3'-dimetil éter, quercetina 7,3'-dimetil éter (Arráez-Román *et al.*, 2006), e naringenina e apigenina (Estevinho *et al.*, 2008). Para méis de determinadas origens botânicas (mel de urze, mel de citrinos, mel de girassol, etc.) é possível determinar padrões de flavonóides característicos, que podem ser usados na determinação da sua origem geográfica (Anklam, 1998).

Relativamente, aos ácidos fenólicos foram identificados como dominantes os ácidos gálico e *p*-cumárico, e como constituintes minoritários os ácidos cafeíco, ferrúlico, elágico e clorogénico, siríngico, vanílico, cinámico e *p*-hidroxibenzoico (Baltrušaitytė *et al.*, 2007; Bertoncelj *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2008).

Os méis de urze podem ainda, caracterizar-se pela presença de concentrações elevadas de ácido benzóico, ácido fenilacético, ácido mandélico e ácido  $\beta$ -feniláctico (Anklam, 1998).

#### **1.2.2.9. Outros compostos**

No mel foram também identificadas vitaminas C, B (tiamina) e do complexo B2, como riboflavina, ácido nicotínico e ácido pantoténico (Olaitan *et al.*, 2007).

O teor de matérias insolúveis na água é um método importante para detectar impurezas do mel, as quais não podem exceder o máximo permitido pela legislação, de 0,1g/100g de mel.

A condutividade eléctrica do mel está directamente relacionada com a concentração de sais minerais, ácidos orgânicos e proteínas, podendo ser útil para seleccionar méis de diferentes origens florais (Acquarone *et al.*, 2007). O valor máximo admitido é 0,8 mS/cm. Alguns autores já referiram existir uma correlação linear entre a determinação das cinzas e condutividade eléctrica (Acquarone *et al.*, 2007).

#### **1.2.2.10. Cor**

A cor do mel, além do *flavour* e aroma, é uma das características que permite identificar a sua origem floral, e pode variar de amarelo pálido a âmbar, e de âmbar vermelho escuro até quase preto (Bertoncelj *et al.*, 2007).

A cor do mel está relacionada com o seu conteúdo em minerais e compostos fenólicos e é característica da origem botânica (Bertoncelj *et al.*, 2007; Baltrušaitytė *et al.*, 2007; Finola *et al.*, 2007). Pode ainda variar com a idade e as condições de armazenamento, mas a transparência ou claridade depende da quantidade de partículas suspensas, como o pólen (Olaitan *et al.*, 2007).

Durante o armazenamento pode ocorrer o escurecimento do mel devido a reacções Maillard, caramelização da frutose e reacções de polienóis, sendo o grau de escurecimento dependente da temperatura e/ou tempo de armazenamento (Bertoncelj *et al.*, 2007).

#### **1.2.2.11. Espectro polínico**

A análise polínica do mel tem como objectivo identificar a sua origem botânica, e, em alguns casos, a sua origem geográfica, pois este nunca tem origem apenas numa única fonte floral.

O termo mel “monofloral” é usado para descrever mel produzido principalmente a partir de uma espécie de planta. Geralmente, o mel para ser considerado monofloral de um pólen tem que possuir, pelo menos 45% desse pólen. No entanto, esta percentagem não é válida quando uma fonte floral conduz a néctar com um conteúdo em grãos de pólen maior ou menor que a média. Por exemplo, o mel de castanha necessita de possuir pelo menos 90% de pólen de *Castanea* para ser monofloral (Anklam, 1998), mas o mel de lavandula para ser considerado monofloral, só necessita de apresentar 15% de grãos de pólen da espécie *Lavandula* sp. (Russo-Almeida e Paiva, 1996; Maia *et al.*, 2003).

### **1.3. MICROBIOTA DO MEL**

A qualidade do mel não é só influenciada pelas propriedades físicas e químicas mas também pelos microrganismos presentes. A sobrevivência de microrganismos no mel é influenciada pelo tipo de mel e pelo seu teor de água. O baixo teor de água deste produto inibe o crescimento bacteriano. Os fungos são, geralmente, mais tolerantes que as bactérias ao elevado efeito osmótico (Olaitan *et al.*, 2007). As propriedades intrínsecas do mel afectam o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos por acção bacteriostática ou bactericida e, particularmente, o pH baixo e o elevado teor de açúcares do mel previne o crescimento de muitos microrganismos (Iurlina e Fritz, 2005). Consequentemente, espera-se que o mel contenha um pequeno número e uma variedade limitada de microrganismos.

De acordo com Snowdon e Cliver (1996) estes microrganismos podem ser divididos em três categorias: (1) microrganismos que são encontrados normalmente no mel (certas estirpes de leveduras e bactérias formadoras de esporos); (2) microrganismos indicadores da qualidade sanitária ou comercial (coliformes ou leveduras); e (3) microrganismos que em determinadas condições (por exemplo, germinação e crescimento num produto não tratado termicamente), podem causar doenças.

As fontes de microrganismos no mel podem ser classificadas em primárias e secundárias. As fontes primárias de contaminação microbiana incluem o pólen, o tracto digestivo das abelhas, o pó, o ar, a sujidade e as flores (Snowdon e Cliver, 1996; Olaitan *et al.*, 2007). Os microrganismos encontrados na colmeia são principalmente bactérias (*Bacillus*, *Micrococcus*), leveduras (*Saccharomyces* spp.) e bolores (*Aspergillus*) na forma esporulada, e provêm das abelhas, das matérias-primas (néctar) ou de fontes externas. No entanto, verifica-se uma discrepância entre os microrganismos associados às abelhas e os encontrados no mel. Isto sugere que os microrganismos introduzidos pelas abelhas não sobrevivem no mel e que há microrganismos presentes no mel que têm origem noutras fontes de contaminação. Por exemplo, o solo e as flores podem ser fontes de contaminação de leveduras no mel (Snowdon e Cliver, 1996).

As fontes secundárias de contaminação microbiana no mel são o homem, as embalagens e equipamento, o vento, a sujidade, os insectos, os animais e a água. As possíveis vias de transmissão dos microrganismos para o mel incluem o ar (nas casas do mel ou durante o embalamento), os manipuladores (de infecções na pele e contaminação fecal), a contaminação cruzada (dos animais ou de produtos animais) e o equipamento (incluindo resíduos de alimentos e água) (Snowdon e Cliver, 1996). A presença de microrganismos na forma vegetativa, como não evidenciam capacidade de sobreviver no mel, são indicadores de contaminação recente do mel por uma fonte secundária (Snowdon e Cliver, 1996).

As fontes primárias de contaminação são muito difíceis de controlar, mas as fontes secundárias podem ser controladas com uma correcta higienização e com boas práticas de fabrico.

Os principais microrganismos encontrados no mel são bolores, leveduras e bactérias na forma esporulada (Snowdon e Cliver, 1996). Os bolores normalmente, encontrados no mel pertencem aos géneros *Penicillium*, *Mucor* e *Aspergillus*. Estes microrganismos podem sobreviver mas não se reproduzem no mel, por isso contagens elevadas, nomeadamente, de estirpes de *Bettsya alvei*, *Acosphaera apis* e *Acosphaera major* podem indicar uma contaminação recente pelo ambiente de recolha da abelha, colmeia ou equipamento de processamento (Snowdon e Cliver, 1996; Finola *et al.*, 2007).

As leveduras podem crescer em condições de baixo pH e não são inibidas pela sacarose, assim a presença de leveduras osmofílicas no mel é um problema pois o seu crescimento apenas está limitado pela quantidade de água disponível. Algumas



condições, tais como o aumento da humidade, temperatura moderada, granulação, uma contagem elevada de leveduras e a presença de cinzas e azoto fomentam a fermentação do mel (Snowdon e Cliver, 1996). As principais leveduras encontradas no mel pertencem ao género *Saccharomyces*, no entanto, foram já detectadas pertencentes aos géneros *Debaromyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torula*, *Zygasaccharomyces*, entre outros (Snowdon e Cliver, 1996). Os estudos sobre a quantificação de leveduras no mel são escassos, no entanto Rall *et al.* (2003) verificaram uma incidência de 64% de bolores e leveduras em méis obtidos no estado de São Paulo no Brasil. Finola *et al.* (2007) verificaram que a contagem destes microrganismos em méis da Argentina central era inferior a 10 UFC/g. Os méis com uma contagem elevada de leveduras, devido à ocorrência de fermentações, não devem ser comercializados. De facto, as leveduras utilizam os açúcares do mel, com produção de ácido, gás e outros produtos, o que torna o mel impróprio para consumo.

Contrariamente aos bolores e leveduras, as bactérias podem sobreviver no mel mas é pouco provável que se reproduzam (Snowdon e Cliver, 1996). As formas vegetativas de bactérias patogénicas ainda não foram detectadas no mel, e como as bactérias não se replicam no mel, uma contagem elevada de bactérias vegetativas é indicadora de contaminação recente por uma fonte secundária (Iurlina e Fritz, 2005). Alguns dos microrganismos associados ao mel incluem *Bacillus*, *Clostridium*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, entre outros., e muitos destes já foram detectados no mel (Iurlina e Fritz, 2005). Os esporos bacterianos, particularmente os pertencentes aos géneros *Bacillus* e *Clostridium* são habitualmente os mais comuns no mel (Finola *et al.* 2007). Relativamente, ao género *Bacillus*, as espécies mais frequentes são *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, e *B. coagulans* (López e Alippi, 2009). A caracterização microbiológica de méis da Argentina de diferentes proveniências, por Iurlina e Fritz (2005), revelou a presença de *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus laterosporus*, sendo a distribuição destes semelhante para méis comerciais e de apiário. Os esporos de *Clostridium* sulfito-redutores no mel são indicadores de contaminação ou poluição, mas normalmente estão presentes em níveis baixos (Finola *e tal.*, 2007). O consumo de mel contaminado com *C. botulinum* é especialmente perigoso para bebés e crianças pois é a causa de botulismo infantil. Recentemente a presença desta bactéria tem sido referido por alguns autores. Finola *et al.* (2007) detectaram a presença de esporos de clostrídios sulfito-redutores em 70% das amostras de mel analisadas, enquanto as amostras analisadas por Iurlina e Fritz (2005) não revelaram a presença destes microrganismos.

Küplülü *et al.* (2006) num estudo sobre a incidência de esporos de *C. botulinum* em mel da Turquia verificou que o mel vendido nos mercados de Ankara estava significativamente contaminado com este microrganismo.

#### **1.4. PROPRIEDADES BIOATIVAS DO MEL**

O mel, como quase todos os produtos naturais, dependendo da sua origem, pode ter uma grande diversidade de compostos terapêuticos. Com efeito, a fonte floral do mel desempenha um papel fundamental nas suas propriedades biológicas (Basualdo *et al.*, 2007). As características particulares do mel devem-se à multiplicidade de compostos secundários que provêm do néctar e das próprias abelhas, as quais lhe conferem o seu aroma e *flavour* específicos e a sua actividade biológica (Tosi *et al.*, 2004).

O mel contém uma grande variedade de compostos fenólicos e representa uma boa fonte de antioxidantes, o que o torna um bom aditivo alimentar antioxidante e potencia o seu uso a nível medicinal (Al-Mamary *et al.*, 2002; Küçük *et al.*, 2007).

##### **1.4.1. Actividade antioxidante**

Os radicais livres de oxigénio ou, de um modo mais geral, as espécies reactivas de oxigénio (ROS) são produtos normais do metabolismo celular, sendo o seu efeito nocivo, designado por *stress* oxidativo (Valko *et al.*, 2007). As ROS são responsáveis por várias anomalias celulares e o consumo regular de antioxidantes parece limitar ou prevenir os efeitos nefastos provocados por estes radicais livres (Kaur e Geetha, 2006). A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo.

Um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, quando comparadas com o substrato oxidável, atrasam significativamente ou previnem a oxidação desse mesmo substrato (Al-Mamary *et al.*, 2002).

O mel é uma fonte natural de antioxidantes, os quais são efectivos na redução do risco de doença coronária, cancro, cataratas, diferentes processos inflamatórios, entre outras patologias. Pode ainda, prevenir reacções oxidativas de deterioração nos alimentos como a acastanhamento enzimático de frutas e vegetais, a oxidação lipídica

da carne (Arráez-Román *et al.*, 2006), e inibir o crescimento de microrganismos patogénicos e de deterioração de alimentos (Bertoncelj *et al.*, 2007).

O mel é um produto alimentar rico tanto em antioxidantes enzimáticos (glucose oxidase e catalase) como não enzimáticos (ácido ascórbico, flavonóides, ácidos fenólicos, derivados de carotenóides, ácidos orgânicos, produtos das reacções de Maillard, aminoácidos e proteínas) (Meda *et al.*, 2005; Baltrušaitytė *et al.*, 2007).

Recentemente, têm sido publicados inúmeros estudos sobre a avaliação da actividade antioxidante do mel (Taormina *et al.*, 2001; Al-Mamary *et al.*, 2002; Meda *et al.*, 2005; Baltrušaitytė *et al.*, 2007; Bertoncelj *et al.*, 2007; Küçük *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2008; Al *et al.*, 2009), a qual está fortemente correlacionada com o conteúdo em compostos fenólicos e consequentemente com a sua origem botânica (Al-Mamary *et al.*, 2002; Bertoncelj *et al.*, 2007). De facto, verifica-se uma forte correlação entre a actividade antioxidante e a cor do mel. Muitos investigadores verificaram que os méis de cor escura apresentam um teor em compostos fenólicos superior e consequentemente, uma maior actividade antioxidante (Taormina *et al.*, 2001; Bertoncelj *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2008; Al *et al.*, 2009). A cor escura reflecte, em parte, o conteúdo em pigmentos como os carotenóides e flavonóides, muitos dos quais possuem propriedades antioxidantes (Taormina *et al.*, 2001). Aljadi e Kamaruddin (2004) verificaram existir uma correlação significativa entre o teor de água do mel e a sua actividade antioxidante, uma vez que o método apenas reflecte a actividade dos antioxidantes solúveis em água.

#### **1.4.2. Actividade antimicrobiana**

O mel tem sido usado como medicamento durante milhares de anos para o tratamento de doenças respiratórias, infecções gastrointestinais, queimaduras, feridas infectadas e úlceras (Mulu *et al.*, 2004; Küçük *et al.*, 2007; Basualdo *et al.*, 2007). As suas características físicas e químicas conferem-lhe propriedades únicas como um efectivo agente antimicrobiano.

Estudos sobre actividade antibacteriana do mel têm vindo a ser desenvolvidos por muitos investigadores, nomeadamente contra patogénicos resistentes a antibióticos (Nzeako e Hamdi, 2000; Kumar *et al.*, 2005), contra bactérias patogénicas envolvidas em algumas doenças (Mulu *et al.*, 2004; Lusby *et al.*, 2005; Basualdo *et al.*, 2007), contra bactérias alimentares patogénicas (Taormina *et al.*, 2001) e contra bactérias

responsáveis pela deterioração de alimentos (Mundo *et al.*, 2004). As bactérias exibem diferente sensibilidade ao mel. Algumas como, *Staphylococcus aureus* (Estevinho *et al.*, 2008), *Staphylococcus epidermidis* (Basualdo *et al.*, 2007), *Bacillus stearothermophilus* (Mundo *et al.*, 2004) são extremamente sensíveis, enquanto outras, *Staphylococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Basualdo *et al.*, 2007), *Bacillus cereus* (Taormina *et al.*, 2001), *Alcaligenes faecalis*, *Lactobacillus acidophilus* (Mundo *et al.*, 2004), *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis* (Küçük *et al.*, 2007) apenas o são moderadamente. Por outro lado, o crescimento de *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* (Basualdo *et al.*, 2007) e *Pseudomonas aeruginosa* (Estevinho *et al.*, 2008) parece não ser afectado pelo mel.

A informação disponível sobre a capacidade do mel para inibir o crescimento de fungos é limitada. Foram, no entanto, publicados alguns estudos sobre a actividade antifúngica do mel, particularmente contra isolados clínicos de *Candida* sp. (Theunissen *et al.*, 2001; Lusby *et al.*, 2005; Irish *et al.*, 2006; Küçük *et al.*, 2007). De um modo geral, verificou-se que alguns méis exibem uma actividade fúngica significativa contra as leveduras do género *Candida*. No entanto, Lusby *et al.* (2005) verificaram que a levedura *Candida albicans* não foi inibida pelos méis testados e Küçük *et al.* (2007) constatou que os três méis estudados exibiram uma actividade antimicrobiana moderada contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

A capacidade antimicrobiana de alguns méis contra os bolores *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* e *Geotrichum candidum* foi testada por Mundo *et al.* (2004), tendo verificado que o seu crescimento não foi inibido por nenhum dos méis.

A actividade antimicrobiana do mel deve-se principalmente às suas propriedades físicas e químicas. A elevada osmolaridade e a acidez do mel, o peróxido de hidrogénio, os compostos voláteis, os ácidos orgânicos, os compostos fenólicos e a lisozima estão entre as substâncias que contribuem para a sua actividade (Theunissen *et al.*, 2001; Mundo *et al.*, 2004; Basualdo *et al.*, 2007). O principal agente antibacteriano no mel é o peróxido de hidrogénio, o qual é produzido enzimaticamente no mel pela glucose oxidase que tem origem nas glândulas hipofaríngeas das abelhas (Olaitan *et al.*, 2007), no entanto, a catalase que tem origem no pólen também aparece no mel (Taormina *et al.*, 2001). O nível de peróxido de hidrogénio no mel é determinado pelos níveis de glucose oxidase e catalase (Weston, 2000). Quanto maior o nível de glucose oxidase, maior o nível de peróxido e quanto menor o nível de catalase, maior o nível de peróxido de hidrogénio. A enzima glucose oxidase está virtualmente inactiva em mel com

elevada densidade, mas torna-se activa no mel diluído, produzindo peróxido de hidrogénio e ácido glucónico a partir da glucose (Al-Mamary *et al.*, 2002; Olaitan *et al.*, 2007). Taormina *et al.* (2001) verificaram que o peróxido de hidrogénio inibiu o crescimento de algumas bactérias alimentares patogénicas. Constataram ainda, que os antioxidantes do mel testado, contribuíram para a sua actividade antimicrobiana, uma vez que esta persistiu no mel tratado com catalase, para a remoção do peróxido de hidrogénio. Nzeako e Hamdi (2000) confirmaram que as bactérias são mais susceptíveis ao peróxido que os bolores e as leveduras. Mundo *et al.* (2004) comprovaram que a inibição do crescimento bacteriano pelo mel, deve-se à sua elevada concentração de açúcares (actividade da água reduzida), à produção de peróxido de hidrogénio e à presença de compostos proteicos.

No entanto, a produção e o tipo de mel produzido pelas abelhas é dependente da flora que existe em cada época. Assim, as flores a partir das quais as abelhas recolhem o néctar para produzir o mel, podem contribuir para as diferenças na actividade antimicrobiana do mel (Nzeako e Hamdi, 2000; Mulu *et al.*, 2004; Basualdo *et al.*, 2007).

## **1.5. HIDROMEL**

O hidromel é uma bebida alcoólica tradicional, que contém 8-18% (v/v) de etanol e resulta da fermentação alcoólica do mel conduzida por leveduras.

O hidromel é uma bebida reconhecida como das mais antigas consumidas pelo homem, talvez mesmo antes do vinho e é provavelmente a precursora da cerveja. Antigamente o seu uso era generalizado, mas o desenvolvimento das civilizações e dos recursos agrícolas desencadeou a substituição do hidromel por outras bebidas como o vinho. Na Europa do Norte, região onde a vinha não encontrava as condições necessárias para o seu desenvolvimento, o consumo de hidromel foi bastante popular até o vinho ser importado a baixo custo de regiões do sul. Na actualidade o hidromel ainda é consumido em alguns países, tais como Inglaterra, Polónia, Alemanha, Eslovénia e sobretudo em países africanos, como a Etiópia e África do Sul. Em Portugal, o hidromel apenas é produzido de uma forma caseira, e os produtores e apicultores, tal como noutros países, deparam-se com inúmeros problemas durante a sua produção.

Existem poucos estudos disponíveis sobre hidromel e nalguns países produtores, como a Polónia, uma das razões para a diminuição da sua produção está relacionada com a falta de avanço científico nesta área. Alguns problemas descritos por Sroka e Tuszyński (2007) estão relacionados com a fermentação do mosto e a maturação do hidromel, que pode ir de alguns meses até anos, o que faz com que seja economicamente inviável.

Os mostos de hidromel são caracterizados pelo pH baixo e por uma combinação de ácidos que têm origem no mel, os quais podem influenciar a taxa de fermentação. A taxa de fermentação do hidromel depende, sobretudo, da variedade do mel, da estirpe de levedura, da composição do meio de cultura e do pH extracelular (Navrátil *et al.*, 2001). Devido ao elevado conteúdo em açúcares, o processo fermentativo é bastante lento e necessita que o pH, a temperatura, a estirpe de levedura e os factores de crescimento sejam os mais adequados. A identificação e eliminação dos factores que diminuem a actividade celular podem tornar o processo de produção mais rápido, e assim reduzir os custos (Sroka e Tuszyński, 2007).

As leveduras usadas na produção de hidromel são normalmente, as estirpes utilizadas na produção de vinho, cerveja e champanhe. Actualmente, existem diversas estirpes diferentes de leveduras enológicas, que são maioritariamente de *Saccharomyces cerevisiae*, e cujos numerosos compostos sintetizados podem variar bastante entre estirpes (Schuller e Casal, 2005). No entanto, a maior parte destas leveduras enológicas não estão adaptadas às condições presentes no mosto de mel, nomeadamente, níveis de açúcar elevados, valores de pH baixos e concentrações reduzidas de azoto.

Uma condição de *stress* é qualquer factor ambiental que possa exercer um efeito adverso no crescimento celular (Ivorra *et al.*, 1999). Durante a fermentação alcoólica o crescimento das leveduras é afectado por várias condições adversas, nomeadamente *stress* oxidativo, osmótico, ao etanol e privação de azoto, as quais as células devem detectar e responder para a fermentação não ser afectada negativamente (Zuzuarregui e del Olmo, 2004). Assim, a análise da resistência ao *stress* pode ser usada como critério para a selecção de leveduras enológicas, uma vez que existe uma relação entre o desempenho fermentativo das leveduras e a resistência às condições de *stress* (Zuzuarregui e del Olmo, 2004).

De acordo com Nikolaou *et al.* (2006), para seleccionar estirpes de leveduras com as características desejadas é necessário ter em consideração determinados critérios, tais como, tolerância a uma produção de etanol elevada, esgotamento dos

açúcares e actividade fermentativa elevada, crescimento a temperaturas baixas e elevadas, crescimento na presença de concentrações de açúcar elevadas e boa produção de glicerol. Procura-se também, uma produção reduzida de dióxido de enxofre, de espuma, de sulfureto de hidrogénio e de acidez volátil, bom perfil enzimático (actividades elevadas de  $\beta$ -glucosidase proteolítica), produção baixa de acetaldeído e ausência de produção de aminas biogénicas.

Os atrasos e amuos do processo fermentativo são um dos principais problemas na produção de hidromel, devido aos baixos níveis de substâncias azotadas e minerais presentes no mel, indispensáveis para a multiplicação das leveduras e ao pH ácido do caldo fermentativo que afecta a evolução do processo. Assim, é imperioso um controlo rigoroso das condições de fermentação.

De todos os nutrientes assimilados pelas leveduras durante a fermentação, os compostos azotados, são quantitativamente os mais importantes, depois dos compostos carbonados, pois são essenciais para o crescimento e metabolismo das leveduras (Casellas, 2005). A quantidade de azoto disponível para as leveduras depende das fontes de azoto assimilável presentes no mosto e da concentração de etanol, que afecta negativamente a assimilação do azoto. O aumento da concentração de etanol e o uso progressivo das fontes de azoto pelas leveduras ao longo da fermentação, pode conduzir à privação de azoto e consequentemente a condições de *stress* (Ivorra *et al.*, 1999).

Um fornecimento inadequado de azoto assimilável no meio de fermentação pode levar ao crescimento deficiente da levedura, a fermentações prolongadas, a taxas de crescimento reduzidas e consequentemente a um decréscimo da produtividade. Adicionalmente, a qualidade organoléptica do produto pode deteriorar-se devido ao catabolismo de aminoácidos e péptidos causando a formação de sulfureto de hidrogénio (H<sub>2</sub>S), de determinados ésteres e de padrões alterados de diacetil (O'Connor-Cox e Ingledew, 1991). Os requisitos mínimos de azoto são ditados pela taxa de crescimento da levedura desejada nesse meio.

Outro problema na produção de hidromel está relacionado com a falta de uniformidade do produto final. Como o conteúdo de água do mel é variável de ano para ano, a quantidade de água a adicionar ao mel tem que ser ajustada, de modo a obter um teor alcoólico estandardizado no produto final. Porém, como actualmente o hidromel é feito de uma forma empírica, não é feito este ajuste, obtendo-se bebidas muito diferentes.

No produto final, podem ainda ocorrer refermentações por leveduras e fermentações secundárias por bactérias lácticas e acéticas que metabolizam os açúcares residuais, aumentando a acidez volátil e produzindo determinados ésteres (Casellas, 2005). A presença destes compostos altera a qualidade organoléptica do hidromel, nomeadamente o aroma e sabor, tornando esta bebida desagradável para consumo. Finalmente, as etapas, desejáveis, de clarificação e filtração do produto final encarecem bastante o processo de produção.

Na tentativa de solucionar os problemas e dificuldades encontrados durante o processo de produção de hidromel, já foram efectuados alguns estudos, nomeadamente sobre variações no conteúdo de ácidos orgânicos durante a fermentação do mosto de hidromel (Sroka e Tuszyński, 2007). Estes investigadores identificaram e quantificaram os ácidos carboxílicos no mosto de hidromel e estudaram as transformações que ocorriam durante a fermentação, num grupo destes compostos. Verificaram que o mosto contém quantidades relativamente elevadas de ácidos gordos de cadeia média, maioritariamente ácidos decanóico (42 mg/L), dodecanóico (31 mg/L) e octanóico (26 mg/L), que se acredita inibirem a fermentação. Demonstraram, também, que nos primeiros dias de fermentação formam-se principalmente, os ácidos acético e succínico, que vão baixar o pH do mosto, enquanto que o conteúdo em ácidos gordos decresce em 70-80%.

Ukpabi (2006) avaliou a qualidade de hidroméis produzidos com mel de mandioca na Nigéria, usando tecnologia que pode ser adaptada pelos apicultores, pelos produtores de mandioca e pela indústria alimentar, e concluiu que, de um modo geral eram aceitáveis para os provadores. Verificou também que o hidromel, em que mel diluído foi sujeito a um tratamento térmico, preservou-se melhor microbiologicamente que o não tratado termicamente. Os resultados experimentais indicaram ainda, que para aumentar o tempo de vida útil deste hidromel eram necessárias decantações secundárias ou filtrações e engarrafamento anaeróbico apropriado.

A produção de hidromel é realizada, normalmente, por células livres de *Saccharomyces cerevisiae*, no entanto as células imobilizadas podem aumentar, significativamente, a taxa de fermentação. A principal vantagem, é a diminuição do preço do produto final, uma vez que a preparação é usada continuamente com células em concentrações elevadas. Navrátil *et al.* (2001) desenvolveram um estudo no sentido de tentar diminuir o tempo de fermentação do hidromel, utilizando células de uma estirpe de *S. cerevisiae* tolerante ao etanol, imobilizadas num gel de pectato de cálcio.



Os resultados obtidos demonstraram que este processo aumentou a taxa de fermentação, e permitiu a produção de hidromel de modo contínuo.

Apesar do hidromel ser um produto que permite a utilização do mel excedente, estão a ser desenvolvidos novos produtos com a perspectiva de diversificação de produtos derivados do mel, bem como a incorporação deste alimento saudável nos hábitos alimentares.

# **CAPÍTULO II**

## *Material e Métodos*

## **2.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E POLÍNICA DO MEL**

Para a produção de hidromel foram utilizados dois méis típicos da região de Trás-os-Montes, com características diferentes, um mel escuro e outro claro. Para avaliar a qualidade das amostras de mel, foram efectuadas análises físico-químicas e avaliado o espectro polínico.

### **2.1.1. Humidade**

O conteúdo de água do mel foi determinado de acordo com o método refractométrico descrito em Anónimo (1986). A amostra de mel foi homogeneizada e a leitura foi feita com um refractómetro. Os resultados expressam-se em % (p/p).

### **2.1.2. Condutividade Eléctrica**

A condutividade eléctrica do mel foi determinada de acordo com o método descrito em Sancho *et al.* (1991). Dissolveram-se 10 g de mel em 75 mL de água destilada. A solução foi colocada num banho a 20°C e após ter atingido o equilíbrio, fez-se a leitura da amostra num condutivímetro.

O valor obtido foi multiplicado por 1,5 e os resultados apresentam-se em mS/cm ( $10^{-3}$  S/cm).

### **2.1.3. Cinzas Totais**

O conteúdo de cinzas do mel foi determinado por condutivimetria, de acordo com a metodologia proposta por Sancho *et al.* (1991). Após determinação da condutividade, quando o resultado foi inferior a  $0,9 \times 10^{-3}$  S/cm converteu-se o valor em  $10^{-4}$  S/cm e determinou-se o teor de cinzas consultando a tabela apresentada em Sancho *et al.* (1991). Quando o resultado da condutividade foi superior a  $0,9 \times 10^{-3}$  S/cm calculou-se a % de cinzas totais de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ cinzas totais} = 0,083 \times \text{condutividade} - 0,092$$

### **2.1.4. pH**

O pH do mel foi determinado de acordo com o método descrito por Bogdanov *et al.* (1997). Dissolveram-se 10 g de mel em 75 mL de água destilada. Esta solução foi colocada num banho a 20°C e após ter atingido o equilíbrio, o pH foi determinado por leitura directa com o medidor de pH Meter Basic 20.

### 2.1.5. Acidez

A acidez do mel foi determinada de acordo com o método apresentado por Bogdanov *et al.* (1997). Dissolveram-se 10 g de mel em 75 mL de água destilada, de seguida foram adicionadas 4 a 5 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína. Esta solução foi titulada com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N até a mudança de cor se manter durante 10 segundos.

O valor da acidez foi obtido, multiplicando por 10 o volume de NaOH gasto. Os resultados são apresentados em miliequivalentes de ácidos por 1000 g de mel.

### 2.1.6. Hidroximetilfurfural (HMF)

O valor de HMF do mel foi determinado de acordo com o método espectrofotométrico descrito em Anónimo (1986). Dissolveram-se 5 g de mel em 25 mL de água destilada e transferiram-se para um balão volumétrico de 50 mL, ao qual foram adicionados 0,5 mL de solução Carrez I e 0,5 mL de solução Carrez II e perfez-se o volume com água destilada. Após filtrar esta solução, os primeiros 10 mL de filtrado foram rejeitados e recolheram-se aliquotas de 5 mL para dois tubos de ensaio. A um dos tubos adicionaram-se 5 mL de água destilada (solução amostra) e ao outro 5 mL de solução bissulfito de sódio 0,2% (solução referência). Leu-se a absorvância das soluções a 284 e 336 nm num espectrofotómetro UV-visível (Varian Cary 50 Scan model, 1998).

O valor de HMF foi determinado através da seguinte formula:

$$\text{mg HMF/100 g mel} = (\text{Abs}_{284} - \text{Abs}_{336}) \times 14,97 \times (5/\text{g amostra})$$

### 2.1.7. Índice Diastásico

O índice diastásico do mel foi determinado de acordo com o método descrito em Anónimo (1986). Dissolveram-se 10 g de mel em 5 mL de solução tampão acetato pH 5,3 e 20 mL de água destilada. Num balão volumétrico de 50 mL, colocaram-se 3 mL de solução de cloreto de sódio 0,5 M e a solução de mel, e perfez-se o volume com água destilada. Transferiram-se 10 mL desta solução para dois balões volumétricos de 50 mL (balão 1 = solução de referência; balão 2 = solução amostra) que foram colocados num banho a 40°C, juntamente com a solução de amido com um índice de azul entre 0,5 e 0,55. Após 15 minutos no banho, foram adicionados 5 mL de água destilada ao balão 1 e 5 mL de solução de amido ao balão 2. Em intervalos de tempo de 5 minutos, transferiram-se 1 mL dos balões 1 (referência) e 2 (amostra) para balões volumétricos

de 50 mL que continham 10 mL de solução de iodo 0,0007 N e 35 mL de água destilada. Leu-se a absorvância da solução amostra (balão 2) a 660 nm, usando como branco a solução referência (balão 1), num espectrofotômetro UV-visível (Varian Cary 50 Scan model, 1998). A absorvância da amostra foi lida de 5 em 5 minutos, até ser atingido um valor inferior a 0,235.

Construiu-se um gráfico da absorvância em função do tempo, de modo a determinar o tempo em que a absorvância atingiu o valor de 0,235. O índice diastásico foi determinado de acordo com a seguinte formula:  $ID = 300/t$ .

### 2.1.8. Açúcares Redutores

O teor de glucose e frutose do mel foi determinado de acordo com o método descrito por Bogdanov *et al.* (1997). Dissolveram-se 2 g de mel em 50 mL de água destilada, transferiram-se para um balão volumétrico de 200 mL e perfez-se o volume com água destilada (solução de mel). Colocaram-se 50 mL desta solução de mel para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada (solução diluída de mel). Num copo graduado de 250 mL, adicionaram-se 5 mL de solução de Fehling A, 5 mL de solução de Fehling B, 7 mL de água destilada e 14 mL da solução diluída de mel, previamente colocada numa bureta de 25 mL. A solução contida no copo foi aquecida até à ebulição e ferveu durante 2 minutos, após os quais se adicionou 1 mL de azul de metileno 0,2%. Esta solução foi titulada com a solução diluída de mel contida na bureta até haver mudança de cor. O volume da solução diluída de mel gasto na titulação foi subtraído a 25 mL, correspondendo o valor obtido ao volume de água usado na dosagem. Para a dosagem, num copo graduado de 250 mL adicionaram-se 5 mL de solução de Fehling A, 5 mL de solução de Fehling B, o volume de água destilada determinado previamente e 12,5 mL de solução diluída de mel contida na bureta. A solução foi aquecida e ferveu durante 2 minutos, após os quais se adicionou 1 mL de azul de metileno 0,2%. Esta solução foi titulada com a solução diluída de mel da bureta até haver mudança de cor.

O teor em açúcares redutores foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$C = \frac{2000}{P \times V}$$

em que P é o peso da amostra de mel e V é o volume da solução diluída de mel gasto na dosagem.

### **2.1.9. Análise polínica**

A análise polínica do mel foi efectuada de acordo com o método acetolítico proposto em Anónimo (1986). Dissolveram-se 10 g de mel em 30 mL de água destilada e centrifugou-se esta solução a 3500 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante da suspensão foi desprezado após esta ter ficado a sedimentar durante a noite a 2°C. Efectuou-se uma preparação microscópica com uma gota do sedimento e uma pequena porção de glicerogelatina, fixada à chama e solidificada antes da observação. Os diferentes tipos de pólen presentes na amostra foram identificados e quantificados.

## **2.2. SELECÇÃO DE ESTIRPES DE LEVEDURAS E PRODUÇÃO DE HIDROMEL**

Para a produção de hidromel foram seleccionadas sete estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*. Destas sete estirpes, cinco foram isoladas de méis portugueses e foram identificadas por Carvalho *et al.* (2005) por técnicas de biologia molecular. Além das cinco estirpes isoladas do mel, foi ainda seleccionada uma estirpe de referência, W303-1A (Wallis *et al.* 1989) e uma estirpe comercial utilizada na produção de vinho (Premier cru).

### **2.2.1. Caracterização de estirpes de leveduras para a produção de hidromel**

As sete estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas foram caracterizadas quanto à sua resistência ao sulfuroso, resistência ao etanol e ao *stress* osmótico.

Para avaliar estas condições de *stress*, as leveduras cresceram durante a noite em meio líquido YPD a 25°C e com uma agitação de 120 rpm.

#### **2.2.1.1. Efeito do sulfuroso na cinética de crescimento de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae***

Para estudar a resistência das leveduras ao sulfuroso (SO<sub>2</sub>), as células crescidas em YPD foram transferidas para meio mínimo completo suplementado com concentrações de SO<sub>2</sub> de 100, 250 e 500 mg/L. As leveduras foram inoculadas em 200 mL de meio, de modo a obter uma densidade óptica inicial de 0,05. As fermentações decorreram a 25°C durante 48 horas, numa incubadora (Stuart Scientific SI50 model,

2001) com agitação de 120 rpm. Ao longo da fermentação retiraram-se amostras periodicamente para quantificar o crescimento através da medição da densidade óptica a 640 nm, num espectrofotómetro UV-Visível (Unicam Helios, 1997), e da contagem de unidades formadoras de colónias (UFC), em meio YPD sólido. Quando necessário procedeu-se à diluição das amostras. Para as leituras da densidade óptica foi usado como branco, o meio de cultura.

Foi efectuado um controlo, em que as leveduras foram inoculadas em meio mínimo completo sem adição de sulfuroso.

#### **2.2.1.2. Efeito do etanol na cinética de crescimento de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae***

Para avaliar a resistência das leveduras ao etanol, as células foram crescidas em meio líquido YPD contendo 5% (v/v) de etanol (Sigma-Aldrich). As células crescidas foram transferidas para meio líquido YPD, suplementado com diferentes concentrações de etanol, 10 %, 15% e 20% (v/v). As leveduras foram inoculadas em 200 mL de meio, de modo a obter uma densidade óptica inicial de 0,05. As fermentações decorreram a 25°C durante 168 horas, numa incubadora (Stuart Scientific SI50 model, 2001) com agitação de 120 rpm. Ao longo da fermentação foram retiradas amostras periodicamente para quantificar o crescimento através da medição da densidade óptica a 640 nm, num espectrofotómetro UV-Visível (Unicam Helios, 1997), e da contagem de unidades formadoras de colónias (UFC), em meio YPD sólido. Quando necessário procedeu-se à diluição das amostras. Para as leituras da densidade óptica foi usado como branco, o meio de cultura.

Foi efectuado um controlo, em que as leveduras foram inoculadas em meio YPD líquido com 2% de glucose, na ausência de etanol.

#### **2.2.1.3. Efeito dos açúcares na cinética de crescimento de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae***

Para testar a resistência ao *stress* osmótico as células crescidas em 2.2 foram transferidas para meio líquido YPD, contendo 40% de açúcares (20% de glucose e 20% de frutose). As leveduras foram inoculadas em 200 mL de meio, de modo a obter uma densidade óptica inicial de 0,05. As fermentações decorreram a 25°C durante 168 horas, numa incubadora (Stuart Scientific SI50 model, 2001) com agitação de 120 rpm. Ao

longo da fermentação retiraram-se amostras periodicamente para quantificar o crescimento, através da medição da densidade óptica a 640 nm, num espectrofotómetro UV-Visível (Unicam Helios, 1997), e da contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) em meio YPD sólido. Quando necessário procedeu-se à diluição das amostras. Para as leituras da densidade óptica foi usado como branco, o meio de cultura.

Para avaliar o comportamento das estirpes durante a fermentação, periodicamente retiraram-se 1,5 mL de amostra para quantificação da glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético, por HPLC. As amostras foram filtradas com seringa, usando um filtro de nylon de porosidade 0,2 µm (Whatman). Quando necessário, o sobrenadante foi congelado a -24°C (Beko FNE 26400) para análise posterior.

Foi efectuado um controlo, em que as leveduras não estiveram sujeitas a condições de *stress* osmótico, isto é, foram inoculadas em meio YPD líquido com 2% de glucose.

### **2.2.2. Produção de hidromel**

Para estudar a influência da estirpe na produção de hidromel foram utilizadas três estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, duas isoladas de mel e a comercial. As duas estirpes isoladas de mel foram seleccionadas aleatoriamente, uma vez que as sete estirpes estudadas, não apresentaram diferenças significativas de comportamento em condições de *stress*. Foram ainda usados dois tipos de mel, um claro e outro escuro, que foram suplementados com dois tipos de nutrientes em concentração diferentes.

Para produzir hidromel com ambos os suplementos, as três leveduras seleccionadas cresceram durante a noite em meio líquido YPD a 25°C, com uma agitação de 120 rpm.

#### **2.2.2.1. Suplemento 1**

Preparou-se 1 L de uma suspensão de mel com água destilada esterilizada, à qual foi adicionado o seguinte suplemento: 0,4 g/L de nutrientes comerciais; 1 mL/L de SO<sub>2</sub> 6% (v/v) e ácido tartárico até se atingir um pH de 3,2. Após dissolução completa de todos os reagentes, transferiram-se 200 mL para enlenmeyers de 500 mL, previamente esterilizados. Cada estirpe de levedura foi inoculada em 200 mL de mosto de hidromel,



com uma densidade óptica inicial de 0,2. As fermentações decorreram à temperatura ambiente durante 8 dias, numa incubadora (Stuart Scientific SI50 model, 2001) com agitação de 120 rpm. Ao longo da fermentação quantificou-se o crescimento, através da medição da densidade óptica a 640 nm num espectrofotómetro UV-Visível (Unicam Heλios, 1997). Quando necessário procedeu-se à diluição das amostras. Para as leituras da densidade óptica foi usado como branco, a suspensão de mel enriquecida com o suplemento. Para avaliar o comportamento das estirpes durante a fermentação, periodicamente retiraram-se 1,5 mL de amostra para quantificação da glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético, por HPLC. As amostras foram filtradas com seringa, usando um filtro de nylon de porosidade 0,2 µm (Whatman). Quando necessário, o sobrenadante foi congelado a -24°C (Beko FNE 26400) para análise posterior.

No final da fermentação mediu-se o pH do hidromel produzido por cada uma das estirpes.

#### **2.2.2.2. Suplemento 2**

O suplemento 2 foi desenvolvido pela nossa equipa de trabalho, tendo em consideração o que está descrito na literatura sobre fermentações alcoólicas realizadas por *Saccharomyces cerevisiae*.

Preparou-se 1 L de uma suspensão de mel com água destilada esterilizada, à qual foi adicionado o seguinte suplemento: 0,4 g/L de di-hidrogeno fosfato de amónio Merck, Darmstadt); 3,8 g/L tartarato de sódio e potássio 4-hidratado; 0,2 g/L de sulfato de cálcio precipitado; 0,08 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado; 67 µL/L de SO<sub>2</sub> 6% (v/v); 1 g/L de ácido tartárico e 0,3 g/L de bentonite de sódio. Após dissolução completa de todos os reagentes, a mistura foi pasteurizada a 100°C durante 15 minutos. Depois de atingir a temperatura ambiente, mediu-se o pH e transferiram-se 200 mL para enlenmeyers de 500 mL, previamente esterilizados. Cada estirpe de levedura foi inoculada em 200 mL de mosto de hidromel, com uma densidade óptica inicial de 0,2. As fermentações decorreram à temperatura ambiente durante 8 dias, numa incubadora (Stuart Scientific SI50 model, 2001) com agitação de 120 rpm. Ao longo da fermentação retiraram-se amostras periodicamente para quantificar o crescimento, através da medição da densidade óptica a 640 nm num espectrofotómetro UV-Visível (Unicam Heλios, 1997). Quando necessário procedeu-se à diluição das amostras. Para as leituras da densidade óptica foi usado como branco, a suspensão de mel enriquecida

com o suplemento. Para avaliar o comportamento das estirpes durante a fermentação, periodicamente retiraram-se 1,5 mL de amostra para quantificação da glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético, por HPLC. As amostras foram filtradas com seringa, usando um filtro de nylon de porosidade 0,2 µm (Whatman). Quando necessário, o sobrenadante foi congelado a -24°C (Beko FNE 26400) para análise posterior.

No final da fermentação mediu-se o pH do hidromel produzido por cada uma das estirpes.

### **2.2.3. Quantificação de glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético por HPLC**

A glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético foram analisados utilizando um sistema HPLC Varian, equipado com um injetor Rheodyne de 20 µL, uma coluna da Supelco Gel C-610H (300 x 17,8 mm) a 35°C e um detector de índice refractivo RI-4 da Varian. A eluição foi alcançada com uma fase móvel que consistia em ácido fosfórico 0,1% (v/v) com um caudal de 0,5 mL/min. Os dados foram gravados e integrados pelo sistema informático Star Chromatography Workstation da Varian.

A glucose, frutose, etanol, glicerol e ácido acético foram quantificados com base na área dos seus picos e comparação com as curvas de calibração obtidas com os padrões correspondentes.

### **2.2.4. Tratamento dos resultados**

A variação da população ao longo do tempo foi determinada, calculando o logaritmo da densidade óptica ou o logaritmo das unidades formadoras de colónias.

As taxas específicas de crescimento ( $\mu$ ) foram calculadas a partir do declive da relação linear entre os valores da densidade óptica, a 640 nm, e o tempo de fermentação, de acordo com a seguinte equação:

$$\ln N_t = \ln N_0 + \mu t$$

em que  $\mu$  corresponde à taxa específica de crescimento, expressa em unidades do inverso do tempo ( $\text{h}^{-1}$ ), e  $N_t$  e  $N_0$  à densidade populacional, expressa pela D.O. a 640 nm, ao fim do tempo  $t$  e  $t_0$ , respectivamente.

Na produção de hidromel, calcularam-se os rendimentos da fermentação em etanol e glicerol, de acordo com as seguintes equações:

$$Y_{\text{Etanol}} (\%) = \frac{\text{Etanol produzido (g/L)}}{\text{Açúcares consumidos (g/L)}} \times 100$$

$$Y_{\text{Glicerol}} (\%) = \frac{\text{Glicerol produzido (g/L)}}{\text{Açúcares consumidos (g/L)}} \times 100$$

# **CAPÍTULO III**

## *Resultados e Discussão*

### 3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E POLÍNICA DO MEL

Como o hidromel é uma mistura de mel e água, a composição do mel vai influenciar a qualidade do produto final. Assim, antes de se efectuarem os ensaios de produção de hidromel, os méis utilizados foram físico-quimicamente e polinicamente caracterizados. Foram usados dois tipos de mel, um claro e outro escuro, da região de Trás-os-Montes que foram analisados determinando alguns parâmetros estabelecidos na legislação portuguesa (Decreto-Lei nº214/2003 de 18 de Setembro), nomeadamente humidade, pH, acidez livre, condutividade eléctrica, cinzas totais, índice diastásico, hidroxiacetilfurfural (HMF) e açúcares redutores. Além da determinação destes parâmetros, foi ainda efectuada uma análise polínica.

A análise dos pólenes presentes no mel permite determinar a sua origem floral e consiste na identificação e contagem do pólen por exame microscópico. Os pólenes identificados e a sua frequência no mel escuro e claro, apresentam-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Caracterização polínica das amostras de mel utilizadas na produção de hidromel.

	% Pólen	
	Mel Escuro	Mel Claro
<i>Erica</i>	61,91	—
<i>Castanea</i>	14,28	—
<i>Lavandula</i>	14,8	52,0
<i>Rubus</i>	9,53	16,0
<i>Trifolium</i>	—	24,0
Outros	—	8,0

As diferenças mais relevantes entre os dois tipos de mel são o tipo e a quantidade de pólenes presentes. O mel escuro contém pólenes de *Erica*, *Castanea*, *Lavandula* e *Rubus*, sendo o primeiro o pólen dominante (61,91%). Como a percentagem de grãos de pólen de *Erica* sp. foi superior a 45%, o mel escuro pode ser considerado mel monofloral de urze (Anklam, 1998). Quanto ao mel claro, apresentou como pólen dominante o de *Lavandula* (52,0%), contendo ainda pólenes de *Trifolium*, *Rubus* e outros em menor percentagem. A percentagem de pólen de *Lavandula* no mel foi superior a 45%, no entanto, este mel de rosmaninho, para ser considerado monofloral apenas necessita de apresentar 15% de grão de pólen desta espécie (Russo-Almeida e Paiva, 1996; Maia *et al.*, 2003). Resumindo, ambos os méis são monoflorais,

mas enquanto o mel escuro é mel monofloral de urze, o mel claro é mel monofloral de rosmaninho.

Em relação à caracterização físico-química do mel, os resultados obtidos para os diferentes parâmetros analisados, no mel claro e mel escuro, estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Caracterização físico-química das amostras de mel utilizado na produção de hidromel.

	Mel Escuro	Mel Claro
Humidade (%)	16,80	16,20
pH	4,90	3,84
Acidez (meq.Ac/kg)	30,00	23,00
Condutividade Eléctrica (mS/cm)	0,77	0,32
Cinzas Totais (%)	0,55	0,17
Índice Diastásico	14,60	8,65
HMF (mg/Kg)	3,59	16,02
Açúcares Redutores (%)	71,43	68,03

Relativamente aos critérios de composição dos méis, tanto o mel claro como o mel escuro de Trás-os-Montes estão em conformidade com os valores estabelecidos no Decreto-Lei n.º 214/2003 de 18 de Setembro. Quanto às diferenças entre os dois méis, verificou-se que o mel claro apresentou um valor de pH mais baixo (3,84 *versus* 4,90), assim como menor acidez (23,00 *versus* 30,00 Ac meq/Kg), menor índice diastásico (8,65 *versus* 14,60) e maior teor de HMF (16,02 *versus* 3,59 mg/kg) do que o mel escuro. A condutividade eléctrica e o teor de cinzas foram também, mais baixos no mel claro que no mel escuro, 0,32 *versus* 0,77 mS/cm e 0,17 *versus* 0,55%, respectivamente.

O conteúdo de água do mel depende de vários factores, como por exemplo da época da colheita, do grau de maturação do mel alcançado na colmeia e de factores climáticos (de Rodríguez *et al.*, 2004; Finola *et al.*, 2007). O teor de humidade das duas amostras de mel foi quase idêntico e inferior a 20%, o valor máximo permitido na legislação. Os valores obtidos indicam um grau de maturidade e uma altura de extracção do mel adequados, sugerindo que as amostras de mel analisadas são de qualidade. De um modo geral, um teor de humidade elevado pode induzir a fermentação do mel durante o armazenamento, provocando a sua deterioração e perda de *flavour* e também

uma diminuição do seu tempo de vida útil (de Rodríguez *et al.*, 2004; Al *et al.*, 2009; Escriche *et al.*, 2009).

O pH dos dois méis apresentou-se dentro do limite proposto por Iurlina e Fritz (2005) (3,4 – 6,1) e foi inferior para o mel claro. No entanto, como referido por de Rodríguez *et al.* (2004), o pH do mel não está directamente relacionado com a acidez livre devido à acção tampão dos ácidos e minerais presentes.

Os valores de acidez das amostras de mel, encontra-se dentro do limite estabelecido na legislação (50 miliequivalentes de ácidos por 1000 g de mel), indicando a ausência de fermentações indesejáveis do mel. A diferença de valores observada para os dois méis, de acordo com alguns autores, pode ser atribuída à origem botânica do mel (Acquarone *et al.*, 2007; Küçük *et al.*, 2007).

A condutividade eléctrica e o teor de cinzas de ambos os méis cumpriram os limites requeridos. No entanto, os valores obtidos para estes parâmetros foram superiores no mel escuro. O conteúdo de cinzas do mel é determinado principalmente pelo solo e características climáticas (Acquarone *et al.*, 2007). Como as duas amostras de mel são provenientes da mesma região (Parque Natural de Montesinho), as diferenças observadas no teor de cinzas, podem ser atribuídas à diferente origem floral. De facto, segundo de Rodríguez *et al.* (2004) e Finola *et al.* (2007), o teor de cinzas de mel depende do material recolhido pelas abelhas na flora. De acordo com Acquarone *et al.* (2007), este parâmetro pode ser uma função complexa das origens floral e geográfica.

O índice diastásico e o teor de HMF são dois parâmetros amplamente utilizados como indicadores da frescura do mel (de Rodríguez *et al.*, 2004; Küçük *et al.*, 2007; Escriche *et al.*, 2009) e, de acordo com os nossos resultados, os dois méis são produtos frescos. O índice diastásico foi superior a 8, valor mínimo permitido na legislação, para ambos os méis. Porém, o mel claro apresentou um valor de 8,65, muito próximo do mínimo estabelecido, podendo estar relacionado com a origem botânica deste mel como referido por Küçük *et al.* (2007). Para o HMF observou-se que as duas amostras apresentaram valores dentro do permitido por lei, indicando que não foram submetidas a tratamento térmico nem a condições de armazenamento inadequadas (Küçük *et al.*, 2007). Os resultados obtidos para a actividade diastásica e HMF sugerem que o mel escuro é mel de qualidade elevada, pois apresenta um índice diastásico elevado e um teor de HMF baixo.

Os açúcares são os compostos principais de qualquer tipo de mel (Al *et al.*, 2009), sendo os açúcares redutores, principalmente a glucose e frutose, os seus constituintes maioritários (Küçük *et al.*, 2007). O teor de açúcares redutores (glucose e frutose) foi superior a 60%, mínimo estabelecido na legislação, e idêntico em ambos os méis. O conteúdo de açúcares ligeiramente superior no mel escuro (71,43%) pode estar relacionado com a proporção de glucose e frutose, a qual depende amplamente da fonte de néctar (Anklam, 1998). A razão frutose/glucose fornece indicações acerca do estado de cristalização do mel, ou seja, quando o conteúdo de frutose é superior ao de glucose o mel apresenta-se fluido (de Rodríguez *et al.*, 2004; Finola *et al.*, 2007; Al *et al.*, 2009). Assim, como ambas as amostras de mel analisadas se apresentavam fluidas, provavelmente o conteúdo de frutose dos méis era superior ao de glucose.

Os resultados obtidos não foram comparados com os de outros investigadores, devido à ausência de estudos sobre a caracterização físico-química do mel de urze e de rosmaninho.

## **3.2. SELECÇÃO DE ESTIRPES DE LEVEDURAS E PRODUÇÃO DE HIDROMEL**

### **3.2.1. Caracterização de estirpes de leveduras para a produção de hidromel**

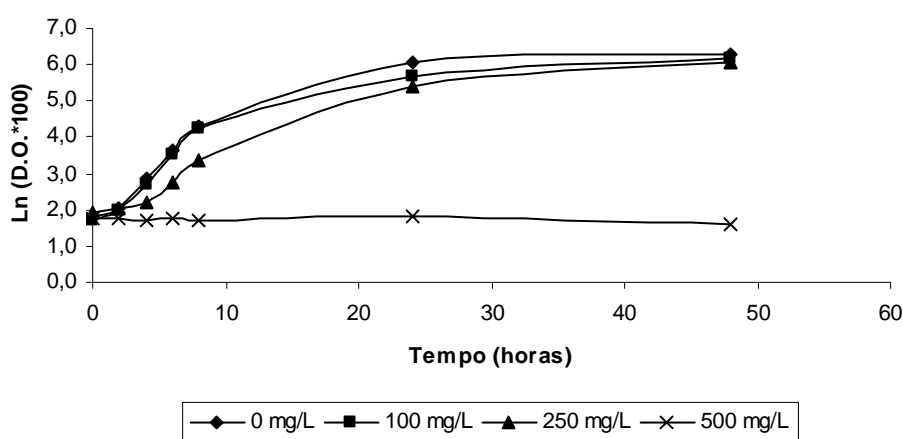
Para seleccionar as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* mais adequadas para a produção de hidromel, foram avaliadas cinco estirpes isoladas de mel de Portugal, uma estirpe de referência e uma comercial em termos da sua resistência a diferentes factores de *stress*. As sete estirpes foram submetidas a diferentes condições de *stress*, nomeadamente, ao sulfuroso, ao etanol e osmótico. Estas experiências permitiram, ainda, comparar o desempenho fermentativo das estirpes isoladas de mel com o da estirpe utilizada em enologia.



### 3.2.1.1. Efeito do sulfuroso na cinética de crescimento de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*

Uma elevada tolerância ao SO<sub>2</sub> é uma característica desejável nas estirpes de leveduras utilizadas em fermentações.

Concentrações de SO<sub>2</sub> até 250 mg/L não afectaram o crescimento das estirpes estudadas. A Figura 1 exemplifica o comportamento de uma estirpe isolada de mel (estirpe 4) em diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>.



**Figura 1.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo da estirpe 4 de *S. cerevisiae* (isolada de mel), crescida na ausência e na presença de diferentes concentrações de SO<sub>2</sub>.

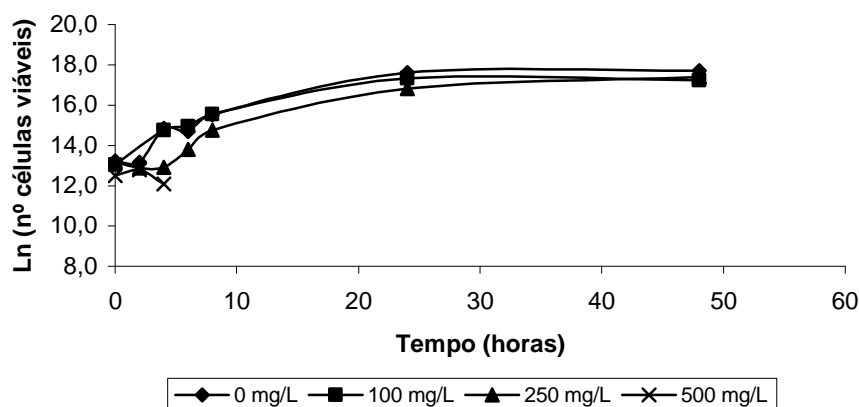
De facto, os valores da taxa específica de crescimento para todas as estirpes estudadas foram semelhantes, na ausência e na presença de concentrações em sulfuroso de 100 mg/L e 250 mg/L (Tabela 3).

**Tabela 3.** Taxas específicas de crescimento de sete estirpes de *S. cerevisiae* na ausência e na presença de concentrações de SO<sub>2</sub> de 100 e 250 mg/L.

Estirpe	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )		
	0 mg/L	100 mg/L	250mg/L
1 (mel)	0,14	0,12	0,14
2 (mel)	0,17	0,15	0,16
3 (referência)	0,17	0,15	0,15
4 (mel)	0,16	0,15	0,15
5 (mel)	0,15	0,12	0,15
6 (mel)	0,16	0,15	0,15
7 (comercial)	0,14	0,13	0,12

Embora a taxa específica de crescimento não tenha sido afectada por concentrações de  $\text{SO}_2$  de 250 mg/L, verificou-se um ligeiro aumento na duração da fase de latência (Figura 1).

A presença no meio de cultura de concentrações de  $\text{SO}_2$  de 500 mg/L inibiu o crescimento de todas as estirpes. Na Figura 2 está representada, como exemplo, a variação da população viável (UFC) da estirpe 4 ao longo do tempo.



**Figura 2.** Variação do número de células viáveis em função do tempo, para a estirpe 4 de *S. cerevisiae* (isolada do mel), na ausência e na presença de diferentes concentrações de  $\text{SO}_2$ .

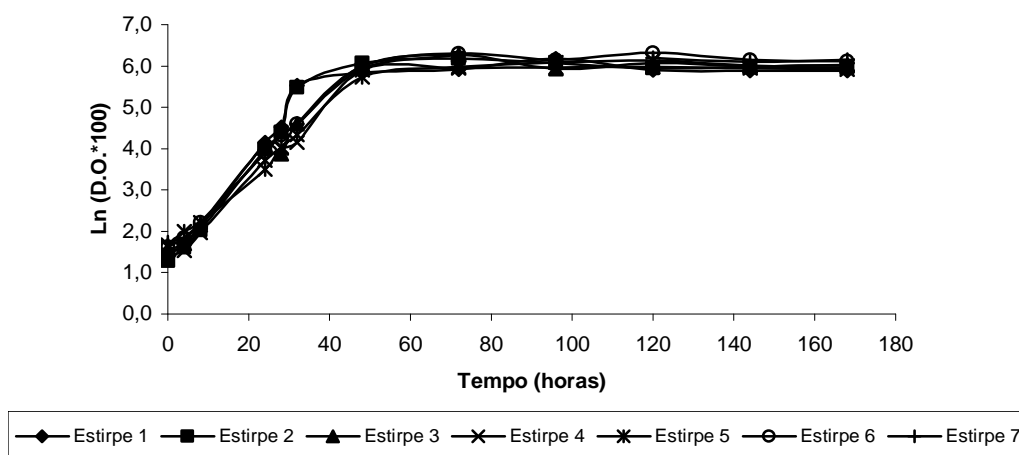
Estes resultados estão de acordo com os divulgados por Nikolaou *et al.* (2006), que testou a resistência de seis estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de mostos de vinho, a diferentes concentrações de dióxido de enxofre (50-300 mg/L). Estes autores observaram que apenas o crescimento de uma estirpe foi afectado por concentrações de  $\text{SO}_2$  de 300 mg/L.

### 3.2.1.2. Efeito do etanol na cinética de crescimento de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*

O *stress* ao etanol é um dos critérios tradicionais usados na selecção de estirpes de leveduras para produção de bebidas alcoólicas. A tolerância das estirpes ao etanol é um factor imprescindível, devido às concentrações elevadas que este álcool atinge

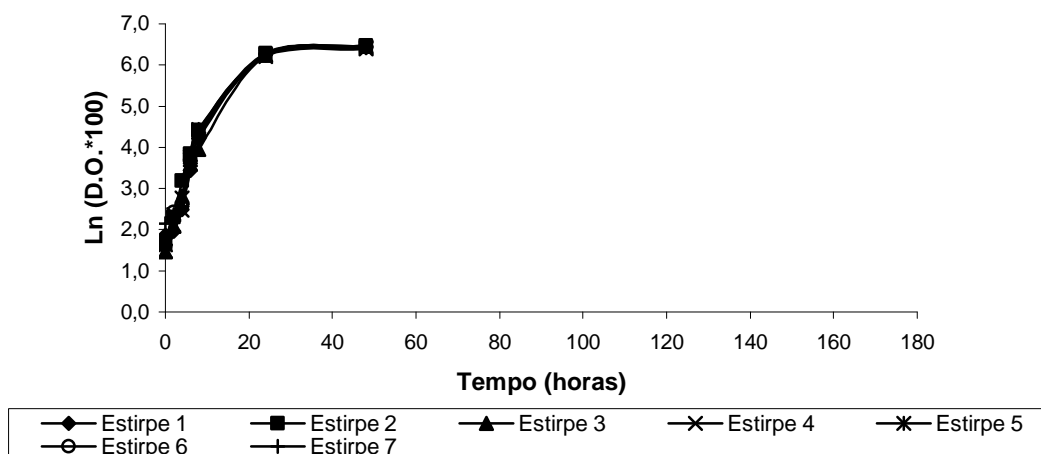
durante a fermentação (Carrasco *et al.*, 2001). Para avaliar o efeito do etanol na viabilidade celular, este foi adicionado em diferentes concentrações ao meio de cultura.

Verificou-se que as sete estirpes de leveduras estudadas apresentaram o mesmo comportamento na presença de 10% (v/v) de etanol (Figura 3).



**Figura 3.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de sete estirpes de *S. cerevisiae*, crescidas na presença de 10% (v/v) de etanol: estirpes 1, 2, 4, 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 3 – estirpe de referência; estirpe 7 – estirpe comercial.

Após 48 horas de fermentação, as estirpes atingiram a fase estacionária e todas alcançaram a mesma biomassa final. Quando comparado com o controlo (Figura 4), o efeito tóxico do etanol reflectiu-se num decréscimo da viabilidade celular e num aumento da duração da fase exponencial de crescimento.



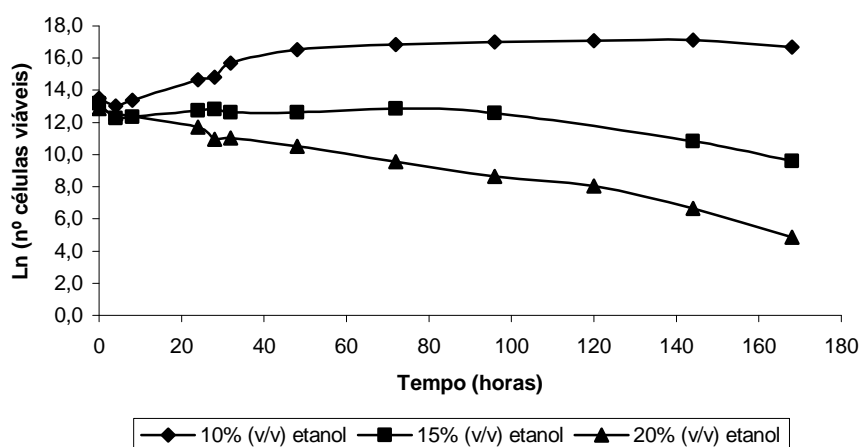
**Figura 4.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de sete estirpes de *S. cerevisiae*: estirpes 1, 2, 4, 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 3 – estirpe de referência; estirpe 7 – estirpe comercial.

Estes resultados tiveram como consequência a diminuição para cerca de metade das taxas específicas de crescimento das leveduras em estudo, quando na presença de 10% de etanol, relativamente ao controlo (Tabela 4).

**Tabela 4.** Taxas específicas de crescimento de sete estirpes de *S. cerevisiae* na ausência e na presença de 10% (v/v) de etanol.

Estirpe	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	
	Controlo (0% etanol)	10% (v/v) etanol
1 (mel)	0,18	0,10
2 (mel)	0,16	0,11
3 (referência)	0,18	0,10
4 (mel)	0,18	0,10
5 (mel)	0,17	0,09
6 (mel)	0,17	0,10
7 (comercial)	0,17	0,10

Nas concentrações de etanol de 15% (v/v) e 20% (v/v) verificou-se, em todas as estirpes, a ausência de crescimento, contrariamente ao observado para a concentração de 10%. Na Figura 5, como exemplo, está representada a variação do número de células viáveis ao longo do tempo para a estirpe 4 isolada do mel. Todas as estirpes estudadas apresentaram o mesmo comportamento.



**Figura 5.** Variação do número de células viáveis em função do tempo, para a estirpe 4 de *S. cerevisiae* (isolada do mel), na presença de diferentes concentrações de etanol.

Resultados idênticos foram obtidos por Carrasco *et al.* (2001), ao observarem que todas as estirpes enológicas comerciais estudadas evidenciaram crescimento, para

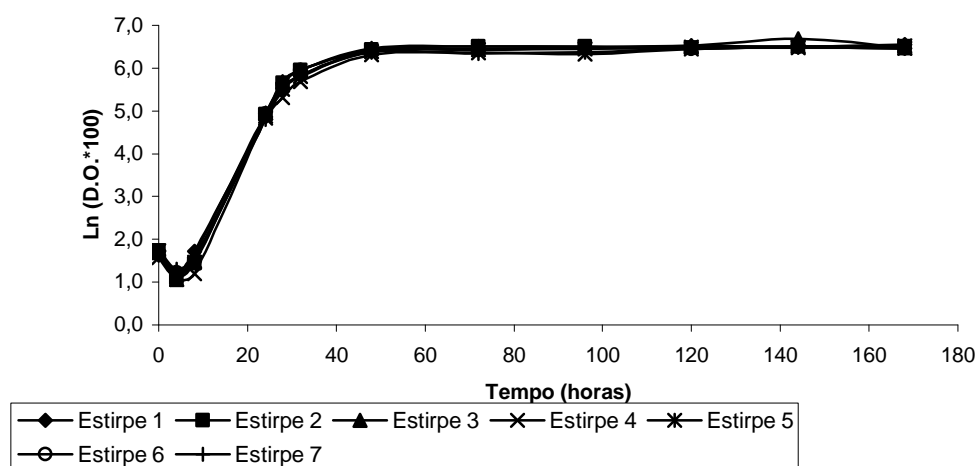
concentrações de etanol de 10% (v/v), sendo a maioria delas afectada significativamente para concentrações de 12% (v/v).

### 3.2.1.3. Efeito dos açúcares na cinética de crescimento de estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*

O *stress* osmótico é uma condição adversa para as leveduras, no início da fermentação, e mais precisamente na produção hidromel, uma vez que o mel tem um teor de açúcares elevado. A avaliação da sobrevivência das estirpes de levedura sob estas condições de *stress* pode fornecer informações úteis sobre a capacidade destas para crescer e realizar a fermentação.

Para avaliar o comportamento de sete estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* ao *stress* osmótico, foram adicionados ao meio de cultura 20% (p/v) de glucose e 20% (p/v) de frutose, de modo a simular, o melhor possível, a concentração de açúcares presentes no mel.

Todas as estirpes apresentaram um comportamento semelhante na presença de 40% de açúcares (Figura 6).



**Figura 6.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de sete estirpes de *S. cerevisiae*, submetidas a *stress* osmótico (20% (p/v) glucose + 20% (p/v) frutose): estirpes 1, 2, 4, 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 3 – estirpe de referência; estirpe 7 – estirpe comercial.

As taxas específicas de crescimento, apresentadas na Tabela 5, variaram entre 0,18 h<sup>-1</sup> (estirpe 1) e 0,20 h<sup>-1</sup> (estirpes 2 e 4). Verificou-se que durante o crescimento das estirpes nestas condições de stress, as taxas específicas de crescimento não diminuíram, quando comparadas com o controlo, notando-se, antes pelo contrário, um ligeiro aumento.

**Tabela 5.** Taxas específicas de crescimento de sete estirpes de *S. cerevisiae* na ausência e na presença de concentrações de açúcar de 40% (20% (p/v) glucose + 20% (p/v)).

Estirpe	M (h <sup>-1</sup> )	
	Controlo	20%glucose + 20% fructose
1 (mel)	0,18	0,18
2 (mel)	0,16	0,20
3 (referência)	0,18	0,19
4 (mel)	0,18	0,20
5 (mel)	0,17	0,19
6 (mel)	0,17	0,19
7 (comercial)	0,17	0,19

Como todas as estirpes apresentaram um comportamento semelhante, às condições de *stress* estudadas, para a primeira fase de produção de hidromel foram seleccionadas aleatoriamente duas estirpes isoladas do mel, as estirpes 5 e 6. Como controlo seleccionou-se a estirpe 7 de *Saccharomyces cerevisiae*, usada frequentemente em enologia.

### 3.2.2. Comportamento fermentativo das estirpes seleccionadas

Para avaliar as diferenças entre as três estirpes de leveduras seleccionadas para a produção de hidromel, analisou-se o seu desempenho fermentativo em meio sintético contendo 20% (p/v) de glucose e 20% (p/v) de frutose. Quantificaram-se os produtos da fermentação, nomeadamente o etanol, o glicerol e o ácido acético e a glucose e frutose consumidas, e determinaram-se os rendimentos da fermentação em etanol e glicerol. Na Tabela 6 apresentam-se os resultados obtidos para as três estirpes (estirpes 5 e 6, isoladas do mel, e estirpe 7, comercial).

**Tabela 6.** Quantificação dos produtos da fermentação (etanol, glicerol e ácido acético (g/L)) e dos açúcares consumidos (glucose e frutose (g/L)) durante fermentações conduzidas por três estirpes de *S. cerevisiae*, em meio YPD contendo 20% (p/v) de glucose e 20% (p/v) de frutose.

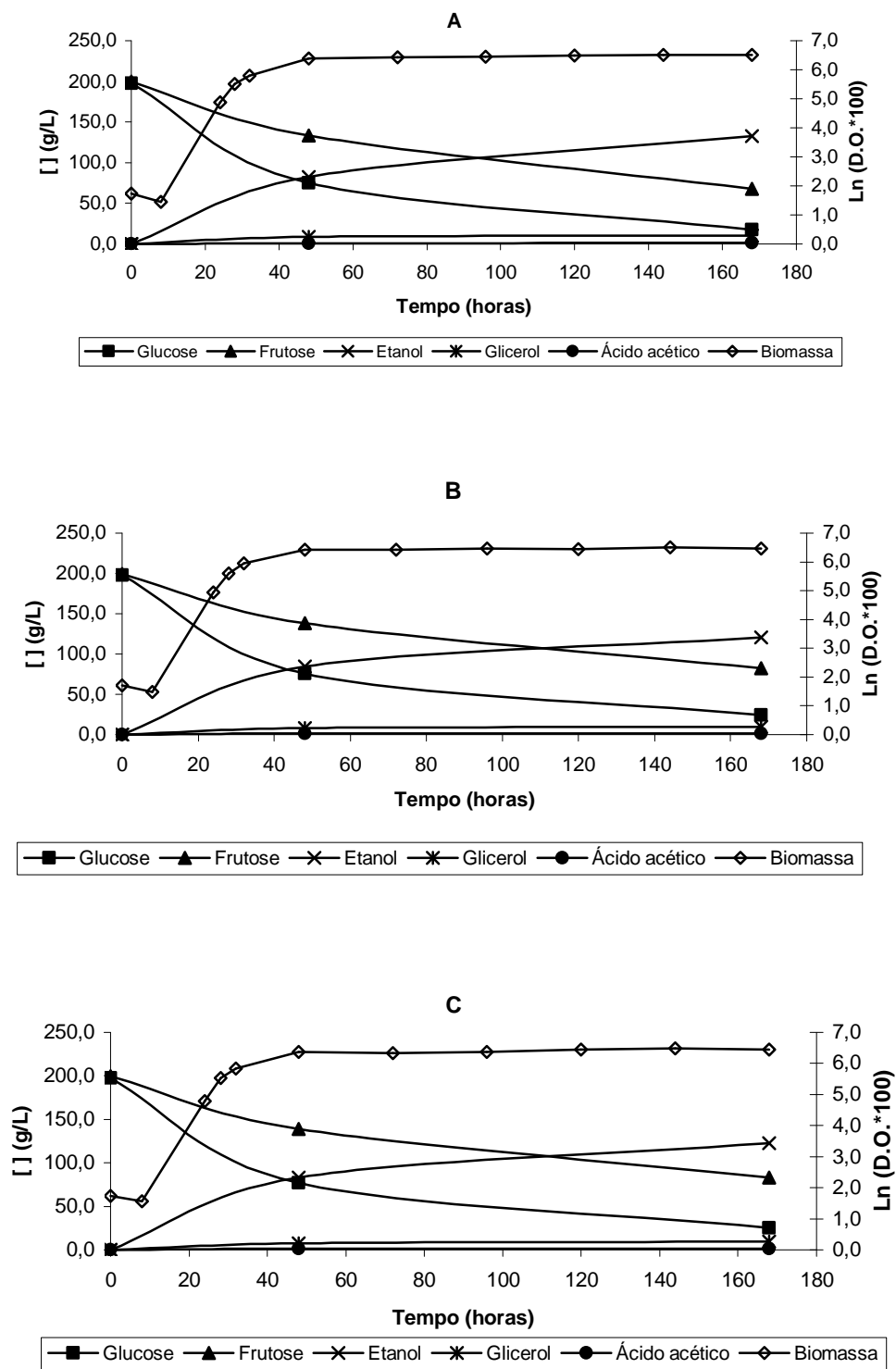
Tempo (horas)	Glucose (g/L)	Frutose (g/L)	Etanol (g/L)	Y <sub>Etanol</sub> (%)	Glicerol (g/L)	Y <sub>Glicerol</sub> (%)	Ácido acético (g/L)
Estirpe 5							
0	197,77	199,58	n.d.	42,38	n.d.	3,38	n.d.
168	17,45	67,72	132,29		10,54		1,64
Estirpe 6							
0	197,77	199,58	n.d.	41,34	n.d.	3,21	n.d.
168	23,99	82,43	120,26		9,35		1,66
Estirpe 7							
0	197,77	199,58	n.d.	42,41	n.d.	3,26	n.d.
168	25,32	83,20	122,49		9,41		1,70

n.d. – não detectado.

Os resultados mostram que o comportamento das três estirpes foi idêntico. O rendimento da fermentação e a produção de ácido acético foi semelhante para todas as estirpes. No entanto, comparando os açúcares totais consumidos e a produção de etanol, verifica-se que a estirpe 6 foi a que apresentou menores rendimentos. A produção de ácido acético foi superior à quantidade normalmente produzida por *Saccharomyces cerevisiae* (de 0,25 a 0,5 g/L). No entanto, em determinadas condições fermentativas, particularmente em fermentações de meio com elevada concentração de açúcar, o conteúdo de acidez volátil pode ser superior a 1,8 g/L (Bely *et al.*, 2008).

Na Figura 7 apresenta-se o perfil fermentativo das três estirpes, ao longo do tempo. Da análise da figura observa-se que às 168 horas a fermentação ainda não tinha terminado. Verificou-se também o consumo simultâneo de glucose e frutose, durante as fases exponencial e estacionária de crescimento. No entanto, na fase exponencial, houve um consumo preferencial de glucose, relativamente à frutose.

Os resultados obtidos estão de acordo com os estudos efectuados por Bely *et al.* (2008), que verificaram que o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* não foi afectado por concentrações iniciais de açúcar, em mosto de vinho, de 360 g/L. Nestas condições a fermentação terminou ao fim de 11 dias, sendo a produção de etanol de 14% (v/v).



**Figura 7.** Comportamento das estirpes 5 (A), 6 (B) e 7 (C) em meio de cultura YPD suplementado com 20% (p/v) de glucose e 20% (p/v) de frutose.

Como todas as estirpes evidenciaram o mesmo comportamento, não foi possível seleccionar a mais adequada para a produção de hidromel, pelo que, nos estudos

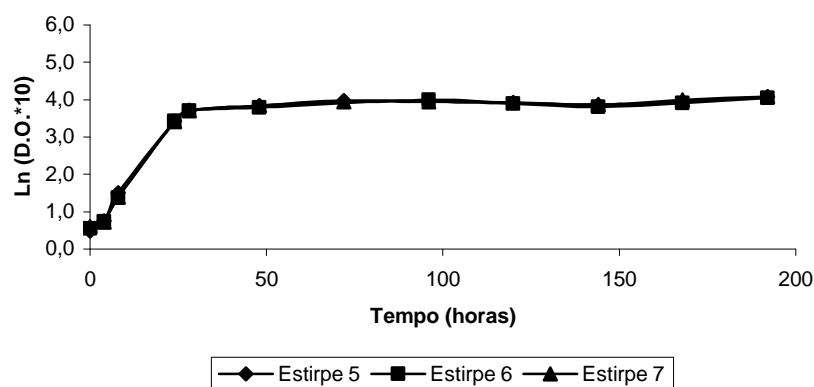


posteriores, continuaram a utilizar-se as estirpes seleccionadas anteriormente (estirpes 5 e 6, isoladas do mel e a estirpe 7, comercial).

### 3.2.3. Produção de hidromel

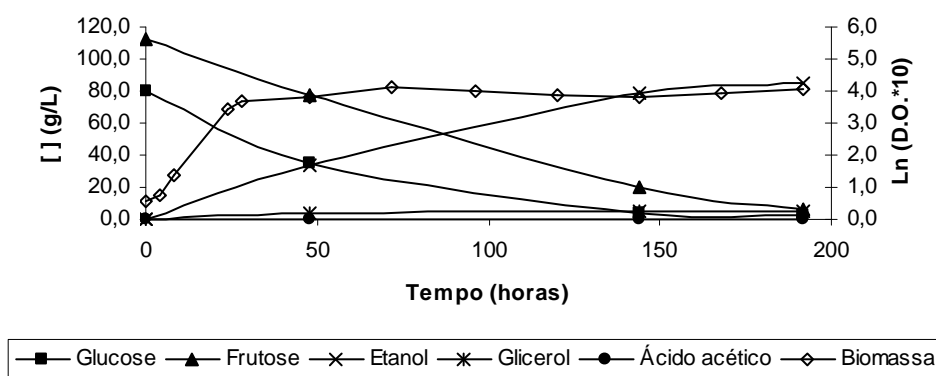
As estirpes seleccionadas anteriormente (estirpes 5 e 6) e a estirpe comercial (estirpe 7) foram usadas para otimizar as condições de produção de hidromel. Para caracterizar as estirpes de levedura e estudar o seu comportamento na produção de hidromel realizaram-se várias fermentações. Cada estirpe foi submetida a fermentações com dois méis diferentes enriquecidos com dois suplementos. Deste modo, foi possível avaliar a importância do tipo de mel utilizado, bem como dos nutrientes adicionados, no crescimento da levedura e na produção de etanol, glicerol e ácido acético. O primeiro suplemento adicionado à solução de mel era composto por nutrientes comerciais e o segundo foi desenvolvido pela nossa equipa de trabalho.

Na produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 1 (nutrientes comerciais) o comportamento das três estirpes foi semelhante (Figura 8).



**Figura 8.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de três estirpes de *S. cerevisiae*, utilizadas na produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 1: estirpes 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 7 – estirpe comercial.

Como exemplo, na Figura 9 apresenta-se o desempenho fermentativo da estirpe 6 nas condições de crescimento referidas anteriormente.



**Figura 9.** Comportamento da estirpe 6 de *S. cerevisiae* durante a produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 1.

Verificou-se que, para todas as estirpes estudadas, a fermentação terminou por volta das 200 horas. Observou-se um aumento progressivo do consumo de glucose e frutose, obtendo-se a máxima produção de etanol, aproximadamente, às 150 horas. Convém salientar que estes resultados diferem daqueles descritos na literatura (Ilha *et al.*, 2000), sendo previsto observar durante o crescimento exponencial a máxima produção de etanol e o máximo consumo de açúcares. Porém, no nosso caso, a máxima produção de etanol foi durante a fase estacionária.

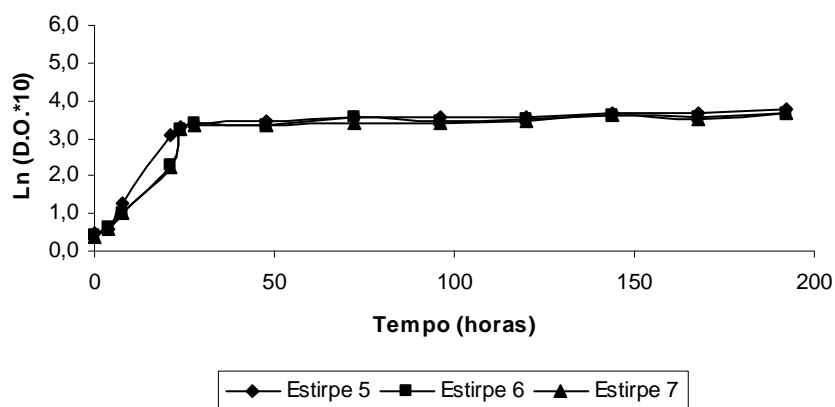
Conforme se pode observar na Tabela 7, a produção de etanol foi semelhante para todas as estirpes, sendo o rendimento da fermentação ligeiramente superior para a estirpe 7 (47,32%). Esta estirpe foi a que apresentou menor rendimento em glicerol (2,77%), cuja produção foi cerca de 5 g/L para todas as estirpes. A acidez volátil aumentou durante as fermentações, principalmente como resultado de síntese de ácido acético, atingindo o valor máximo de 0,3 g/L, no final.

**Tabela 7.** Quantificação dos produtos de fermentação (etanol, glicerol e ácido acético (g/L)) durante a produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 1.

Tempo (horas)	Etanol (g/L)	Y <sub>Etanol</sub> (%)	Glicerol (g/L)	Y <sub>Glicerol</sub> (%)	Ácido acético (g/L)
<i>Estirpe 5</i>					
0	n.d.		n.d.		n.d.
192	84,12	45,90	5,52	3,01	0,30
<i>Estirpe 6</i>					
0	n.d.		n.d.		n.d.
192	85,43	46,64	5,22	2,85	0,30
<i>Estirpe 7</i>					
0	n.d.		n.d.		n.d.
192	86,45	47,32	5,07	2,77	0,30

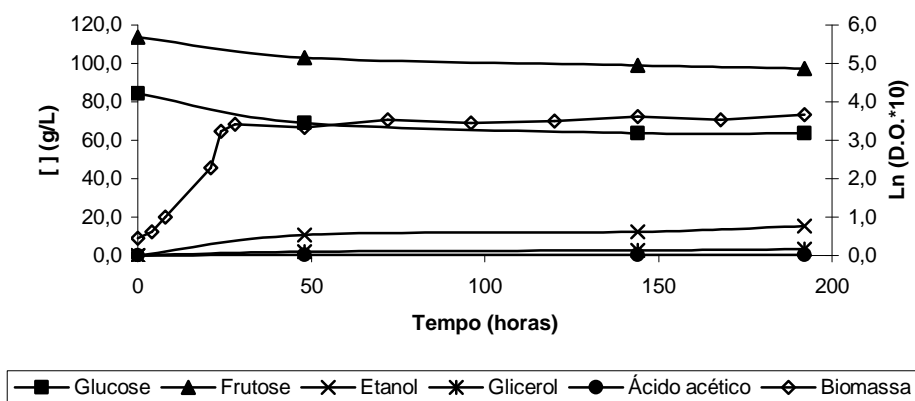
n.d. – não detectado

Na Figura 10 está representado o crescimento das três estirpes de leveduras durante a produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 1 (nutrientes comerciais). Neste caso, apesar da taxa específica de crescimento ser idêntica à observada com o mel escuro, observou-se paragem da fermentação.



**Figura 10.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de três estirpes de *S. cerevisiae*, utilizadas na produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 1: estirpes 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 7 – estirpe comercial.

Não se verificaram diferenças no comportamento das estirpes estudadas, ou seja, as fermentações utilizando mel claro suplementado com nutrientes comerciais pararam, para as três estirpes, após aproximadamente 50 horas (Figura 11). Os açúcares praticamente não foram utilizados pelas leveduras e a produção de etanol foi reduzida.



**Figura 11.** Comportamento da estirpe 6 de *S. cerevisiae* durante a produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 1.

Na Tabela 8 observa-se que, nestas condições de fermentação o rendimento em glicerol das três estirpes foi aproximadamente o dobro (7,60 - 9,27 g/L) do obtido na fermentação com mel escuro (2,77 - 3,01 g/L), sugerindo que as estirpes estavam em condições de *stress*. No entanto, a produção de ácido acético (0,33 – 0,35 g/L) foi relativamente semelhante em todos os casos (0,3 g/L).

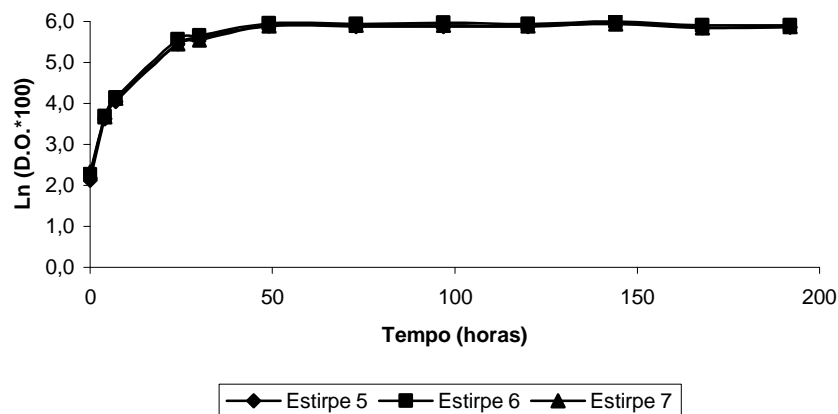
**Tabela 8.** Quantificação dos produtos de fermentação (etanol, glicerol e ácido acético (g/L)) durante a produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 1.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>Y<sub>Etanol</sub> (%)</b>	<b>Glicerol (g/L)</b>	<b>Y<sub>Glicerol</sub> (%)</b>	<b>Ácido acético (g/L)</b>
<i>Estirpe 5</i>					
0	n.d.	---	n.d.	9,01	n.d.
192	17,26	---	3,52	9,01	0,34
<i>Estirpe 6</i>					
0	n.d.	---	n.d.	9,27	n.d.
192	15,45	---	3,44	9,27	0,35
<i>Estirpe 7</i>					
0	n.d.	---	n.d.	7,60	n.d.
192	16,04	---	3,31	7,60	0,33

n.d. – não detectado

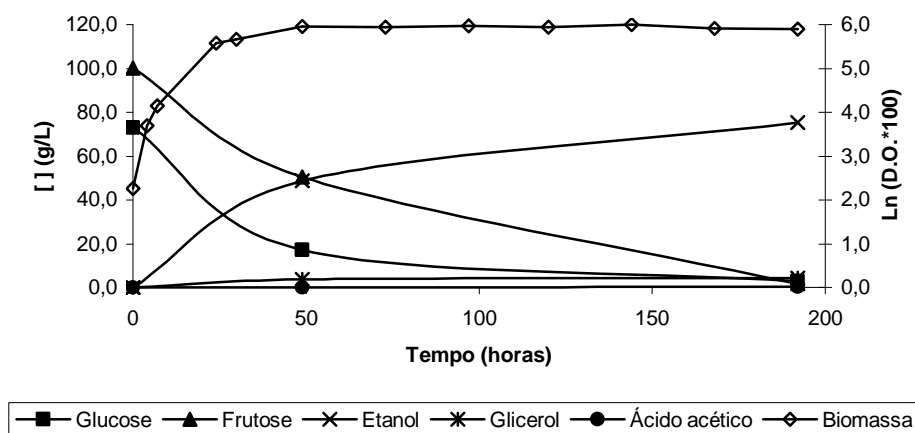
A privação de azoto pode ser uma possível explicação para a paragem da fermentação quando se utiliza mel claro e os nutrientes comerciais. De facto, o mel claro tem uma percentagem de pólen mais reduzida que o mel escuro, e como a maioria dos compostos azotados estão presentes no pólen, o teor de azoto pode ser o factor limitante da fermentação. Adicionalmente, um teor em minerais mais reduzido, expresso pelo baixo teor de cinzas do mel claro (Tabela 2), pode também contribuir para a inibição do crescimento da levedura.

A produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 2 (elaborado pela equipa) foi idêntica para as três estirpes (Figura 12).



**Figura 12.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de três estirpes de *S. cerevisiae*, utilizadas na produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 2: estirpes 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 7 – estirpe comercial.

Como exemplo, apresenta-se na Figura 13 o perfil fermentativo da estirpe 6. Verificou-se que a fermentação terminou por volta das 200 horas após inoculação, como é indicado pelos níveis de açúcares residuais e pela produção de etanol.



**Figura 13.** Comportamento da estirpe 6 de *S. cerevisiae* durante a produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 2.

No entanto, na produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 2, observa-se um comportamento de fermentação típico. A máxima produção de etanol ocorreu nas primeiras 48 horas de fermentação, quando cerca de 65% do total do etanol já tinha sido produzido. Ilha *et al.* (2000) obtiveram resultados

semelhantes quando utilizaram mel para produzir vinagre, tendo observado que durante a fermentação alcoólica, a maior produção de álcool ocorreu até às 36 horas.

Relativamente aos produtos da fermentação e aos rendimentos em etanol e glicerol, apresentados na Tabela 9, não se verificaram diferenças significativas entre as estirpes.

**Tabela 9.** Quantificação dos produtos de fermentação (etanol, glicerol e ácido acético (g/L)) durante a produção de hidromel com mel escuro enriquecido com o suplemento 2.

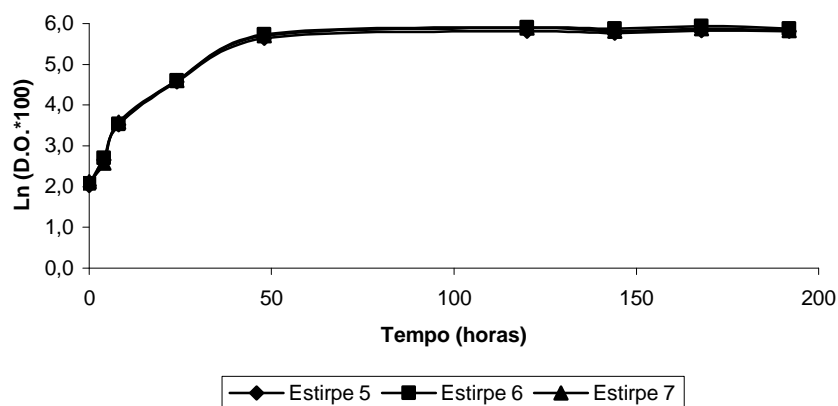
Tempo (horas)	Etanol (g/L)	Y <sub>Etanol</sub> (%)	Glicerol (g/L)	Y <sub>Glicerol</sub> (%)	Ácido acético (g/L)
<i>Estirpe 5</i>					
0	n.d.		n.d.		n.d.
192	76,22	45,16	4,68	2,77	0,33
<i>Estirpe 6</i>					
0	n.d.		n.d.		n.d.
192	75,32	44,70	4,41	2,62	0,42
<i>Estirpe 7</i>					
0	n.d.		n.d.		n.d.
192	76,78	45,57	4,26	2,53	0,42

n.d. – não detectado

O rendimento da fermentação em etanol foi cerca de 45%, para todas as estirpes. A produção de glicerol variou entre 4,26 g/L (estirpe 7) e 4,68 g/L (estirpe 5). Estas concentrações de glicerol estão de acordo com as concentrações referidas para as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de vinho (Nikolaou *et al.*, 2006). O glicerol, um dos compostos mais importantes do vinho, melhora a sua qualidade, pois influencia a doçura, plenitude e suavidade. Em contrapartida, a formação de ácido acético durante a fermentação é altamente indesejável. Assim, todas as estirpes estudadas produziram quantidades relativamente baixas deste ácido, 0,33 g/L para a estirpe 5, e 0,42 g/L para as estirpes 6 e 7. Estes valores também estão de acordo com os normalmente referidos para *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações vínicas, que variam entre 0,25 e 0,5 g/L (Nikolaou *et al.*, 2006; Bely *et al.*, 2008). No entanto, Sroka e Tuszyński (2007), ao estudarem a influência dos ácidos orgânicos presentes no mel na produção de hidromel, verificaram que após sete dias de fermentação a concentração de ácido acético era de, aproximadamente, 0,75 g/L.

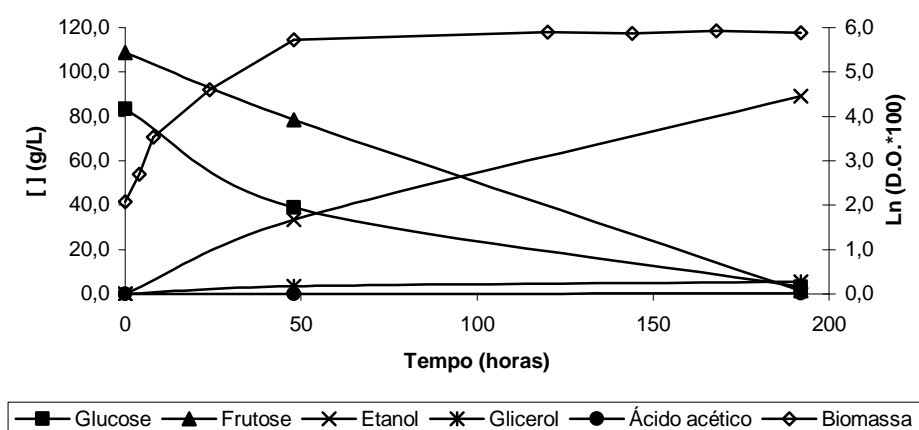
Finalmente, a produção de hidromel com mel claro e o suplemento 2, desenvolvido pela equipa de investigação, apesar de não revelar diferenças entre as

estirpes isoladas do mel e a estirpe comercial (Figura 14), mostrou que ocorreu fermentação e produção de etanol.



**Figura 14.** Variação da densidade óptica (640 nm) em função do tempo de três estirpes de *S. cerevisiae*, utilizadas na produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 2: estirpes 5, 6 – estirpes isoladas do mel; estirpe 7 – estirpe comercial.

Relativamente ao comportamento fermentativo nestas condições, todas as estirpes apresentaram um comportamento idêntico ao da estirpe 6, representado na Figura 15.



**Figura 15.** Comportamento da estirpe 6 de *S. cerevisiae* durante a produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 2.

A fermentação terminou por volta das 200 horas, com o consumo completo de glucose e frutose. Contrariamente ao verificado com o mel escuro e este suplemento, com o mel claro observou-se um aumento progressivo da produção de etanol até as 192

horas, sugerindo que a fermentação não ocorreu de uma forma normal. Deste modo, tanto o mel claro, como o suplemento usado não foram adequados para a produção de hidromel.

Relativamente aos produtos de fermentação não se verificaram diferenças entre estirpes (Tabela 10), mas observam-se algumas diferenças comparando estas condições de fermentação com a anterior (mel escuro enriquecido com o suplemento 2).

**Tabela 10.** Quantificação dos produtos de fermentação (etanol, glicerol e ácido acético (g/L)) durante a produção de hidromel com mel claro enriquecido com o suplemento 2.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>Y<sub>Etanol</sub> (%)</b>	<b>Glicerol (g/L)</b>	<b>Y<sub>Glicerol</sub> (%)</b>	<b>Ácido acético (g/L)</b>
<i>Estirpe 5</i>					
0	n.d.		n.d.		n.d.
192	88,85	47,69	5,67	3,04	0,45
<i>Estirpe 6</i>					
0	n.d.		n.d.		n.d.
192	89,26	47,62	5,44	2,90	0,36
<i>Estirpe 7</i>					
0	n.d.		n.d.		n.d.
192	89,65	47,82	5,21	2,78	0,37

n.d. – não detectado

A produção de etanol e glicerol foi ligeiramente superior à observada na produção de hidromel com mel escuro e o suplemento 2 (Tabela 9). O rendimento em etanol foi cerca de 48% e o de glicerol rondou os 3%. Relativamente à produção de ácido acético, e contrariamente, ao observado para o mel escuro, em que a estirpe 5 foi a que produziu menores concentrações de ácido (0,33 g/L), para o mel claro esta estirpe foi a que produziu a concentração mais elevada (0,45 g/L).

Em todas as fermentações de hidromel verificou-se uma redução do pH inicial em, aproximadamente, 0,5. Apesar de se verificarem diferenças entre as estirpes na produção de ácido acético, em todos os casos, as concentrações estão abaixo dos limites referidos na literatura (Nikolaou *et al.*, 2006; Sroka e Tuszyński, 2007; Bely *et al.*, 2008), pelo que a redução do pH se deve, provavelmente, à produção de outros ácidos. De facto, os estudos de Sroka e Tuszyński (2007) demonstraram que, durante os primeiros dias de fermentação de mosto de hidromel, os principais ácidos que se produzem são o acético e o succínico. Estes ácidos são responsáveis pela redução do valor de pH, o qual se mantém praticamente inalterado até ao fim da fermentação. Em estudos posteriores proceder-se-á à quantificação de outros ácidos, além do acético.



Como já foi referido, o processo fermentativo foi semelhante para as três estirpes, no entanto o hidromel produzido pela estirpe 5 revelou um aroma e sabor desagradáveis. Provavelmente, os compostos responsáveis por estas alterações são compostos fenólicos, tais como etilfenol ou etilguaiaicol, ou sulfureto de hidrogénio. Assim, estão a ser efectuados estudos suplementares, no sentido de identificar estes compostos, recorrendo a técnicas cromatográficas. Por este motivo, esta estirpe de levedura não será utilizada em estudos posteriores.

Uma vez que os nutrientes comerciais e o mel claro, enriquecido quer com o suplemento comercial quer com o suplemento elaborado pela equipa, não se mostraram adequados para produção de hidromel, provavelmente devido à limitação de nutrientes, terão que ser testadas novas formulações do meio de fermentação, utilizando-se diferentes fontes de azoto.

Relativamente ao mel escuro, os dados obtidos neste trabalho, onde o comportamento fermentativo não adequado à produção de hidromel se verificou na presença de nutrientes comerciais, não estão de acordo com os relatados por Navratil *et al.* (2001). Estes autores quando testaram diferentes fontes de nutrientes na produção de hidromel, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* em cultura descontínua, observaram que a eficiência dos dois nutrientes comerciais estudados era muito maior do que do fosfato de amónio, mostrando a importância da fonte de azoto no processo fermentativo.

## **CAPÍTULO IV**

### *Considerações Finais*

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente trabalho pretendeu-se caracterizar o mel da região de Trás-os-Montes, e contribuir para a optimização das condições de produção de um derivado do mel, o hidromel.

Existem poucos estudos sobre o mel nacional, e menos ainda sobre o mel do Nordeste de Portugal, concretamente do da região de Trás-os-Montes. Assim, a primeira parte deste trabalho teve como objectivo contribuir para um melhor conhecimento de dois tipos de mel, claro e escuro, do Parque Natural de Montesinho.

Os parâmetros físicos e químicos analisados sugerem que o mel da região de Trás-os-Montes é um produto alimentar de qualidade. Apesar de tudo, os apicultores enfrentam enormes dificuldades no seu escoamento, e muitas vezes utilizam o excesso de mel para produzir hidromel. No entanto, como a produção desta bebida é realizada de modo artesanal, deparam-se com vários problemas. A maior parte destes problemas parecem estar relacionados com as estirpes utilizadas na fermentação do mel, que normalmente são as leveduras comerciais utilizadas na produção do vinho e da cerveja, as quais não estão adaptadas às condições do hidromel, nomeadamente, elevada concentração de açúcares, valor de pH baixo e concentrações de azoto reduzidas. Assim, na segunda parte do trabalho fomos seleccionar estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de mel, que já estão adaptadas às condições de *stress* deste produto, para produzir hidromel.

Para seleccionar as estirpes de *S. cerevisiae* mais adequadas à produção de hidromel estudou-se o comportamento ao *stress* osmótico, resistência ao etanol e ao sulfuroso de cinco estirpes isoladas do mel, uma estirpe de referência e uma estirpe comercial. Verificou-se que todas as estirpes estudadas apresentaram comportamento semelhante às condições de *stress*, sugerindo que todas são adequadas para a produção de hidromel.

A produção de hidromel, utilizando duas estirpes isoladas de mel e a estirpe comercial, mostrou que todas as estirpes exibiram o mesmo comportamento. No entanto, o hidromel produzido pela estirpe 5, isolada do mel, revelou um aroma desagradável, tornando-a imprópria para a produção desta bebida.

Constatou-se que na produção de hidromel, a composição do meio de cultura, nomeadamente, o tipo de mel usado e os suplementos adicionados, foi o que mais condicionou as características do produto final. Os melhores resultados foram obtidos

quando se utilizou o mel escuro enriquecido com o suplemento preparado pela nossa equipa, tendo em conta as necessidades das leveduras (suplemento 2).

A influência do suplemento e do tipo de mel na produção de hidromel foi bastante evidente quando se utilizou mel claro e o suplemento comercial, verificando-se uma paragem da fermentação. Este resultado comprova as dificuldades sentidas pelos apicultores quando produzem hidromel de forma empírica.

A paragem da fermentação pode ser explicada pela falta de azoto. De facto, o mel claro tem menor proporção de pólen, onde estão presentes a maioria dos compostos azotados, que o mel escuro. Além disso, o mel claro apresenta outros factores que podem diminuir o crescimento das leveduras, nomeadamente pH e conteúdo em minerais, expresso pelo teor de cinzas, inferiores ao do mel escuro.

Os conhecimentos adquiridos relativamente à produção de hidromel permitiram reduzir os tempos de fermentação deste produto. No entanto, outros estudos estão a ser conduzidos sobre a formulação dos meios de fermentação, estando a ser testadas diferentes fontes de azoto, diferentes concentrações de mel, assim como diferentes temperaturas de fermentação, no sentido de aumentar a qualidade do produto final.

No futuro serão efectuados também, ensaios experimentais em contínuo, utilizando células imobilizadas, com o objectivo de reduzir os custos inerentes à filtração e à clarificação desta bebida alcoólica.

## **CAPÍTULO V**

### *Referências Bibliográficas*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acquarone, C., Buera, P., Elizalde, B., 2007. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry*, **101**, 695–703.
- Al, M.L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., Bogdanov, S., 2009. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, **112**, 863-867.
- Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M., 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, **22**, 1041-1047.
- Aljedi, A.M., Kamaruddin, M.Y., 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, **85**, 513-518.
- Anklam, E., 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, **63**(4), 549–562.
- Anónimos, 1986. Métodos oficiales de análisis para la miel. Orden de 12 de Junio de 1986 de la Presidencia del Gobierno, “Boletín Oficial del Estado” nº 145 de 18 de Junio de 1986. XXIII – Edulcorantes naturales y derivados.
- Anónimo, 2001. Codex Standard for Honey (Codex Stan 12-1981 (Rev. 2-2001)). Codex Alimentarius.
- Arráez-Román, D., GómezCaravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Segura-Carratero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2006. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis–electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1648-1656.
- Azeredo, L.C., Azeredo, M.A.A., Souza, S.R., Dutra, V.M.L., 2003. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, **80**, 249-254.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R., Čeksterytė, V., 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, **101**, 502-514.
- Basualdo, C., Sgroi, V., Finola, M.S., Marioli, J.M., 2007. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*, **124**, 375-381.

- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **122**, 312-320.
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T., 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, **105**, 822-828.
- Bogdanov, S., Martin, P., Lüllmann, C., 1997. Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, **28**, 1-59.
- Carrasco, P., Querol, A., del Olmo, M., 2001. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch. Microbiol.*, **175**, 450-457.
- Carvalho, M., Rocha, A., Estevinho, L., Choupina, A., 2005. Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **1**, 11-17.
- Casellas, G.B., 2005. Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism. Tese de Doutoramento. Universitat Rovira i Virgili.
- Castro-Vasquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A., Pérez-Coello, M.S., 2009. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, **112**, 1022-1030.
- de Rodríguez, G.O., Ferrer, B.S., Ferrer, A., Rodríguez, B., 2004. Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*, **84**, 499-502.
- Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, Diário da República Iª Série A.
- Escríche, I., Visquert, M., Juan-Borrás, M., Fito, P., 2009. Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*, **112**, 329-338.
- Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, E., 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 3774-3779.
- Finola, M.S., Lasagno, M.C., Marioli, J.M., 2007. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, **100**, 1649-1653.
- Ilha, E.C., Sant'Anna, E., Torres, R.C., Porto, A.C., Meinert, E.M., 2000. Utilization of bee (*Apis mellifera*) honey for vinegar production at laboratory scale. *Acta Científica Venezolana*, **51**, 231-235.

- Irish, J., Carter, D.A., Shokohi, T., Blair, S.E., 2006. Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Medical Mycology*, **44**, 289-291.
- Iurlina, M.O., Fritz, R., 2005. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology*, **105**, 297-304.
- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J.E., del Olmo, M., 1999. An inverse correlation between *stress* resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A Molecular Study. *Biotechnology and Bioengineering*, **64**, 698-708.
- Kaur, I.P., Geetha, T., 2006. Screening Methods for Antioxidants-A Review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **6**, 305-312.
- Küçük, M., Kolailı, S., Karaoğlu, Ş., Ulusoy, E., Baltacı, C., Candan, F., 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, **100**, 526-534.
- Kumar, A., Kaushik, R., Kashyap, A., Kashyap, M.K., 2005. Indian honey: a natural product with antibacterial activity against antibiotic resistant pathogens, an “in vitro” study. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **8**, 190-193.
- Küplülü, Ö., Göncüoğlu, M., Özdemir, H., Koluman, A., 2006. Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. *Food Control*, **17**, 222-224.
- López, A.C., Alippi, A.M., 2009. Diversity of *Bacillus megaterium* isolates cultured from honeys. *Food Science and Technology*, **42**, 212-219.
- Lusby, P.E., Coombes, A.L., Wilkinson, J.M., 2005. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Archives of Medical Research*, **36**, 464-467.
- Maia, M., Russo-Almeida, P.A., Pereira, J.O.B., 2003. Contribuição para a caracterização do mel da região do Alvão-Marão. *O Apicultor*, **39**, 19-23.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O.G., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, **91**, 571-577.
- Mulu, A., Tessema, B., Derby, F., 2004. *In vitro* assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. *Ethiop.J.Health Dev.*, **18**(2), 107-112.
- Mundo, M.A., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W., 2004. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, **97**, 1-8.



- Navrátil, M., Sturdík, E., Gemeiner, P., 2001. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology Letters*, **23**, 977–982.
- Nikolaou, E., Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Tzanetakis, N., 2006. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*, **23**, 205-211.
- Nzeako, B.C., Hamdi, J., 2000. Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. *Medical Sciences*, **2**, 75-79.
- O'Connor-Cox, E.S., Ingledew, W.M., 1991. Alleviation of the effects of nitrogen limitation in high gravity worts through increased inoculation rates. *J. Ind. Microbiol.*, **7**, 89-96.
- Olaitan, P.B., Adeleke, O.E., Ola, I.O., 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences*, **7**, 159-165.
- Rall, V.L., Bombo, A.J., Lopes, T.F., Carvalho, L.R., Silva, M.G., 2003. Honey consumption in the state of São Paulo: a risk to human health?. *Anaerobe*, **9**, 299-303.
- Russo-Almeida, P.A., Paiva, J., 1996. Análise polínica do mel da Terra Quente Transmontana. *O Apicultor*, **13**, 33-42.
- Sancho, M.T., Muniategui, S., Sánchez, P., Huidobro, J.F., Simal, J., 1991. Mieles del Pais Vasco, XI: Evaluación de los distintos tipos de cenizas. *Anales de Bromatologia*, **4**, 311-324.
- Schuller, D., Casal, M., 2005. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. Mini-review. *Appl Microbiol Biotechnol*, **68**, 292-304.
- Sodré, G.S., Marchini, L.C., Moreti, A.C.C.C., Otsuk, I.P., Carvalho, C.A.L., 2007. Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. *Ciência Rural*, **37** (4), 1139-1144.
- Snowdon, J.A., Cliver, D.O., 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, **31**, 1-26.
- Sroka, P., Tuszyński, T., 2007. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, **104**, 1250-1257.
- Taormina, P.J., Niemira, B.A., Beuchat, L.R., 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and

- level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, **69**, 217-225.
- Theunissen, F., Grobler, S., Gedalia, I., 2001. The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. *Apidologie*, **32**, 371-379.
- Tosi, E.A., Ré, E., Lucero, H., Bulacio, L., 2004. Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **37**, 669-678.
- Ukpabi, U.J., 2006. Quality evaluation of meads produced with Cassava (*Manihot esculenta*) floral honey under farm conditions in Nigeria. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, **6**, 37-41.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39**, 44-84.
- Wallis, J.W., Chrebet, G., Brodsky, G., Rolfe, M., Rothstein, R., 1989. A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell*, **58**, 409-419.
- Weston, R.J., 2000. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, **71**, 235-239.
- Won, S.R., Lee, D.C., Ko, S.H., Kim, J.W., Rhee, H.I., 2008. Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*, **41**, 952-956.
- Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., D'Arcy, B., Datta, N., Caffin, N., Raymont, K., 2004. Flavonoid in Australian Malaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, **37**(2), 166–174.
- Zuzuarregui, A., del Olmo, M., 2004. Analyses of *stress* resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie van Leeuwenhoek*, **85**, 271-280.

## CAPÍTULO VI

*Anexos*

## **ANEXO I**

### **Reagentes utilizadas para a caracterização físico-química e polínica do mel**

- **Solução alcoólica de fenolftaleína**

Dissolver 1 g de fenolftaleína em 60 mL de álcool e diluir com água destilada até 100 mL.

- **Solução de Carrez I**

Dissolver 15 g de ferrocianeto de potássio trihidratado em água destilada e perfazer o volume até 100 mL.

- **Solução de Carrez II**

Dissolver 30 g de acetato de zinco dihidratado em água destilada e perfazer o volume até 100 mL.

- **Solução tampão acetato pH 5,3**

Dissolver 87 g de acetato de sódio trihidratado em 400 mL de água destilada, num balão volumétrico de 500 mL. Adicionar 10,5 mL de ácido acético glacial (4,4) e perfazer com água destilada até 500 mL. Ajustar o pH, se necessário, com acetato de sódio ou ácido acético.

- **Solução stock de iodo**

Dissolver 22 g de iodeto de potássio (p.a.) em 40 mL de água destilada. Adicionar 8,8 g de iodo (p.a.), dissolver e perfazer o volume de 1 L com água destilada.

- **Solução de iodo 0,0007 N (solução com validade de 48 horas)**

Dissolver 20 g de iodeto de potássio (p.a.) em 40 mL de água destilada, num balão volumétrico de 500 mL. Adicionar 5 mL de solução stock de iodo e perfazer o volume até 500 mL com água destilada.

- **Solução de iodo 0,02 N (solução diária)**

Dissolver 20 g de iodeto de potássio (p.a.) em 40 mL de água destilada, num balão volumétrico de 500 mL. Adicionar 143 mL de solução stock de iodo e perfazer o volume até 500 mL com água destilada.

- **Solução de amido (o índice de azul tem que estar compreendido entre 0,5 e 0,55)**

Dissolver 1 g de amido anidro em 45 mL de água destilada, num copo de 50 mL. Levar rapidamente à ebulição, agitando sempre, durante 3 minutos. Deixar arrefecer à temperatura ambiente. Adicionar 2,5 mL de tampão acetato pH 3,5. Transferir para um balão volumétrico de 100 mL, colocar em banho-maria a 40°C, e perfazer o volume com água destilada.

Num balão volumétrico de 100 mL, colocar 75 mL de água destilada, 1 mL de ácido clorídrico 1 N, 1,5 mL de solução de iodo 0,02 N, adicionar 0,5 mL de cozimento de amido e perfazer o volume de 100 mL com água destilada. Deixar repousar durante 1 hora no escuro e ler a absorvância a 660 nm. Usar como branco, uma solução de composição idêntica excepto cozimento de amido. O valor de absorvância é igual ao valor de índice de azul, e para valores não compreendidos entre 0,5 e 0,55, é necessário ajustar a massa de amido anidro pesada.

- **Solução de Fehling A**

Dissolver 69,28 g de sulfato de cobre pentahidratado em água destilada, e perfazer o volume até 1 L. Deixar repousar 1 dia antes de usar.

- **Solução de Fehling B**

Dissolver 346 g de tartarato de sódio potássio tetrahidratado e 100 g de hidróxido de sódio (NaOH) em água destilada, perfazer o volume até 1 L e filtrar.

- **Glicerogelatina**

Pesar 7 g de folhas de gelatina, cortadas em pedaços pequenos, colocar num copo de 100 mL e adicionar 42 mL de água destilada. Deixar repousar durante 2 horas. Adicionar à gelatina, agitando sempre, 50 g de glicerina concentrada e 0,5 g de fenol. Aquecer a mistura durante 15 minutos e adicionar umas gotas de fucsina básica. Filtrar a solução através de lã de vidro e recolher o filtrado para uma placa de Petri.

Solução corante de fucsina básica

Dissolver 0,5 g de fucsina básica em 1 mL de etanol 70%, e perfazer o volume de 150 mL com água destilada.

## ANEXO II

### Meios de cultura utilizados para a selecção de leveduras

- **Meio mineral mínimo**

Meio mineral base	700 mL
Solução glucose	300 mL
Solução de vitaminas	0,5 mL
Solução de oligoelementos A	0,5 mL
Solução de oligoelementos B	0,5 mL

Juntar assepticamente as vitaminas e os oligoelementos à solução de glucose, e esterilizar esta solução por filtração. À solução obtida adicionar assepticamente o meio mineral base, obtendo-se deste modo 1 L (700 mL + 300 mL) de meio mineral mínimo completo, líquido e esterilizado.

#### Meio mineral base

Sulfato de amónio	5 g
Fosfato dióxido de potássio	5 g
Sulfato de magnésio	0,5 g
Cloreto de cálcio	0,13 g
Água destilada	700 mL

Dissolver os reagentes acima mencionados em 700 mL de água, e autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

#### Solução de glucose

Glucose	20 g
Água destilada	300 mL

Dissolver 20 g de glucose num litro de água e autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

#### Solução de vitaminas

Biotina	0,01 g
Pantotenato de cálcio	0,8 g
Inositol	40 g
Niacina	1,6 g
Pihidroxina	1,6 g
Tiamina	1,6 g
Água destilada	1 L

Dissolver todos os reagentes num litro de água, esterilizar a solução por filtração e guardar no frigorífico.

#### Solução de oligoelementos A

Borato de hidrogénio	1,0 g
Iodeto de potássio	0,2 g
Molibedato de sódio	0,4 g
Água destilada	1 L

Dissolver todos os reagentes num litro de água e esterilizar a solução por filtração.

#### Solução de oligoelementos B

Sulfato de cobre	0,08 g
Cloreto de ferro	0,4 g
Sulfato de manganês	0,8 g
Sulfato de zinco	0,8 g
Água destilada	1 L

Dissolver os oligoelementos em 0,1 mL de uma solução HCl 1M, a fim e evitar turbacão e depois adicionar a água e esterilizar a solução por filtração.



- **Meio YPD sólido**

Agar	20 g
Peptona	10 g
Extracto de leveduras	5 g
Glucose	20 g
Água destilada	1 L

Dissolver todos os componentes num litro de água e autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Distribuir cerca de 10 mL de meio por cada placa de Petri e deixar solidificar.

- **Meio YPD líquido**

Peptona	10 g
Extracto de leveduras	5 g
Glucose	20 g
Água destilada	1 L

Dissolver todos os componentes num litro de água e autoclavar a 121°C durante 20 minutos.